

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie, Zentrum für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

Einfluss klinischer Parameter auf die Mukosa- assoziierte bakterielle Zusammensetzung in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Christian Alberts, geb. am 11.05.1989 in Bremen

Blücherstrasse 65, 18055 Rostock

Rostock, 13.07.2018

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002455

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht

Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernd Kreikemeyer

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Lerch

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A, Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Einreichung: 13.07.2018

Tag der Promotionsverteidigung: 08.05.2019

Gliederung

1. Einleitung	6
1.1 Epidemiologie	6
1.2 Klinik.....	7
1.2.1 Morbus Crohn.....	7
1.2.2 Colitis ulcerosa	9
1.3 Komplikationen	11
1.4 Ätiologie.....	11
1.4.1 Genetische Faktoren	12
1.4.2 Das Mikrobiom.....	14
1.4.3 Umweltfaktoren.....	19
1.5 Diagnostik	20
1.6 Therapie.....	20
1.6.1 TNF- α -Blocker	21
1.7 Next Generation Sequencing.....	25
2. Fragestellung	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Material	30
3.1.1 DNA Isolation	30
3.1.2 NOD2-Genotypisierung	32
3.1.3 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation für das Illumina MiSeq System.....	32
3.1.4 Software.....	34
3.2 Methoden.....	35
3.2.1 DNA Isolierung.....	35
3.2.2 Vorbereitung der 16S rRNS Gens für für die Sequenzierung mit dem Illumina MiSeq System..	37
3.2.3 Datenanalyse	42
3.2.4 Statistische Analyse.....	43
3.2.5 NOD2-Genotypisierung.....	43
3.2.6 Einteilung der Patienten nach Schweregrad ihrer Erkrankung	44
4. Ergebnisse	47
4.1 Morbus Crohn Patienten.....	47
4.2 Colitis ulcerosa Patienten	49
4.3 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Bakteriendiversität.....	51
4.4 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Bakterienzusammensetzung	53
4.5 Bakterienhäufungen in den verschiedenen Krankheitsaktivitätsgruppen in MC	59

4.6 Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen Charakteristiken und der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in MC Patienten.....	61
5. Diskussion	64
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis.....	71
8. Abkürzungsverzeichnis	94
Danksagung	95
Lebenslauf	96
Thesen	97
Selbstständigkeitserklärung	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Befallsmuster Morbus Crohn	7
Abbildung 2: Endoskopisches Bild Morbus Crohn.....	8
Abbildung 3: Befallsmuster Colitis ulcerosa.....	9
Abbildung 4: Endoskopisches Bild Colitis ulcerosa	10
Abbildung 5: Mögliche Interaktionen der NOD2 Mutation in MC	13
Abbildung 6: Interaktionen zwischen Darmflora und intestinaler Mukosa in CED	17
Abbildung 7: Struktur der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Antikörper IFX und ADA	21
Abbildung 8: Mögliche Mechanismen/Konsequenzen der Tnf- α -Blocker vermittelten Bindung der sTNF und tmTNF und der resultierenden Inhibierung der TNF Rezeptor Aktivierung	24
Abbildung 9: Mögliche Mechanismen der tmTNF- abhängigen TNF- α -Blocker Funktion.....	25
Abbildung 10: Ablauf des Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden	27
Abbildung 11: Ablauf der Paired-End Sequenzierung.....	28
Abbildung 12: 16S V3 und V4 Amplicon Arbeitsablauf.....	38
Abbildung 13: Anzahl der Bakteriengattungen in Biopsien von MC Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität	52
Abbildung 14: Anzahl der Bakteriengattungen in Biopsien von CU Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität	53
Abbildung 15: Bakterienzusammensetzung in MC Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität.....	54
Abbildung 16: Bakterienzusammensetzung gemessen anhand der Bakteriengattungen in MC Biopsieproben.....	55
Abbildung 17: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienflora in MC Patienten.....	56
Abbildung 18: Bakterienzusammensetzung in CU Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität	57
Abbildung 19: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in CU	58
Abbildung 20: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in MC Patienten	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Crohn's Disease Activity Index	44
Tabelle 2: Mayo-Score	46
Tabelle 3: Morbus Crohn-Patienten	47
Tabelle 4: Detaillierte MC-Patienten Übersicht	48
Tabelle 5: Colitis ulcerosa Patienten	50
Tabelle 6: Detaillierte CU Patienten Übersicht	51
Tabelle 7: Anzahl der bakteriellen Gattungen mit einer signifikant erhöhten Bakterienhäufung in verschiedenen Krankheitsaktivitäten-Stufen bei MC	59

1. Einleitung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind rezidivierende oder kontinuierliche Entzündungen des Gastrointestinaltraktes, die zu einer Störung der Funktion und Struktur des Darms führen können. Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die beiden hauptsächlichen klinischen Phänotypen der CED (Podolsky, 2002).

Der Morbus Crohn wurde nach dem Gastroenterologen Burril Bernard Crohn benannt, der zusammen mit zwei Kollegen 1932 am Mount Sinai Krankenhaus in New York Patienten mit einer Entzündung des terminalen Ileums beschrieb (Crohn et al., 2000).

Über die typische Colitis ulcerosa wurde erstmals 1859 von Sir Samuel Wilkes berichtet, der die Krankheit von einer bakteriellen Ruhr unterschied (Crohn, 1962). Die Pathogenese der CED ist noch nicht abschließend geklärt, aber es wird ein Zusammenspiel von genetischen, mikrobiellen und Umweltfaktoren angenommen.

1.1 Epidemiologie

Weltweit gibt es eine Entwicklung zu steigenden Inzidenzen für MC und UC (Timmer, 2009, Molodecky et al., 2012). Besonders in Industrieländern wie Nord- und Westeuropa und Nordamerika sind die CED häufig und zeigen eine Inzidenz für MC und CU von 2,2 – 24,3/100000 Personenjahre (Burisch und Munkholm, 2013, Molodecky et al., 2012). Die Inzidenz für MC lag in Deutschland zuletzt bei 7 pro 100000 Einwohner (Ott et al., 2008). Mehr als 1,4 Millionen Amerikaner und schätzungsweise 2,5 – 3 Millionen Europäer leiden an CED (Loftus 2004; Burisch und Munkholm, 2013), mit einer Prävalenz von 1/198 für CU und 1/310 für MC (Molodecky et al., 2012). Neuere epidemiologische Studien verzeichnen auch einen rasanten Anstieg der Inzidenz in Entwicklungsländern (Molodecky et al., 2012).

Die Erstmanifestation beider Krankheitsentitäten liegt meist im jungen Erwachsenenalter zwischen 15 und 30 Jahren und zeigt kein besonderes Überwiegen eines Geschlechts (Loftus und Sandborn, 2002). Grundsätzlich kann die Erkrankung aber ab der frühen Kindheit in jedem Altersabschnitt auftreten.

Die aktiven Phasen der CED schränken die Lebensqualität der Patienten stark ein (Hoivik et al., 2012; van der Have et al., 2014) und belasten finanziell das Gesundheitssystem (Kawalec, 2016).

1.2 Klinik

Der Verlauf der CED kann individuell stark variieren. Es fehlen gute prädiktive Marker, welche den Verlauf vorhersehen lassen. Je nach Patient kann die Erkrankung eine langsam oder schubweise zunehmende Krankheitsaktivität, chronisch anhaltende oder chronisch intermittierende Aktivität oder einen nur milden Verlauf nach anfänglich schwerem Schub zeigen.

1.2.1 Morbus Crohn

Typisch für MC ist eine diskontinuierliche und segmentale Entzündung, die alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts befallen kann. Es gibt Abschnitte gesunden Darms, die zwischen entzündeten Abschnitten liegen, sogenannte „skip lesions“. Hauptmanifestationsorte sind dabei das terminale Ileum und das proximale Kolon (**Abb.1**).

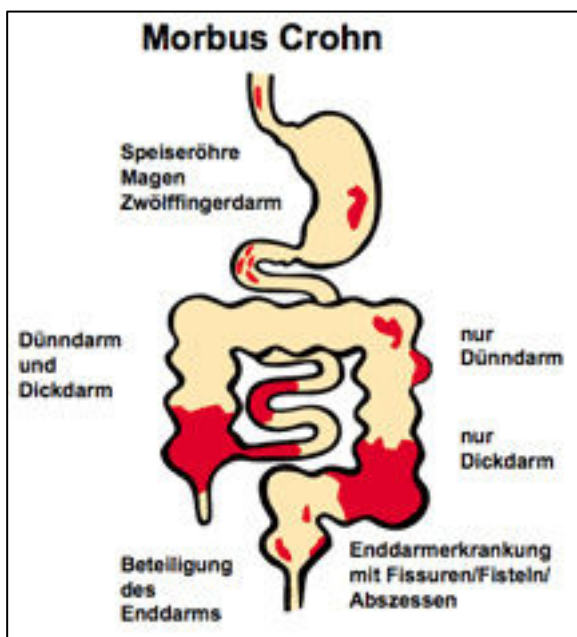


Abbildung 1: Befallsmuster Morbus Crohn: typische Manifestationsorte von MC im Gastrointestinaltrakt. Kompetenz-ced.eV

Die Entzündung ist transmural und kann demzufolge alle Schichten der Darmwand betreffen. Die Krankheitsaktivität lässt sich mit dem „Crohn’s Disease Activity Index“ (CDAI) (Best et al., 1976) bestimmen, der für klinische Parameter Punkte vergibt, um somit die Aktivität in „Remission“, „moderate Aktivität“ und „schwere Aktivität“ einzuteilen.

Klinisch führend ist der Abdominalschmerz mit meist nicht-blutiger Diarrhoe. Weiterhin können Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust auftreten. Beim häufigen Befall des terminalen Ileums kann es durch kolikartige Schmerzen im rechten Unterbauch in der Symptomatik einer Appendizitis ähneln. Makroskopisch entsteht durch Straßen tiefer Ulzerationen in Form von sogenannten „Schneckenspuren“, in Nachbarschaft zu entzündlich verdickten Schleimhautinseln, das sogenannte „Pflastersteinphänomen“ (Abb. 2).

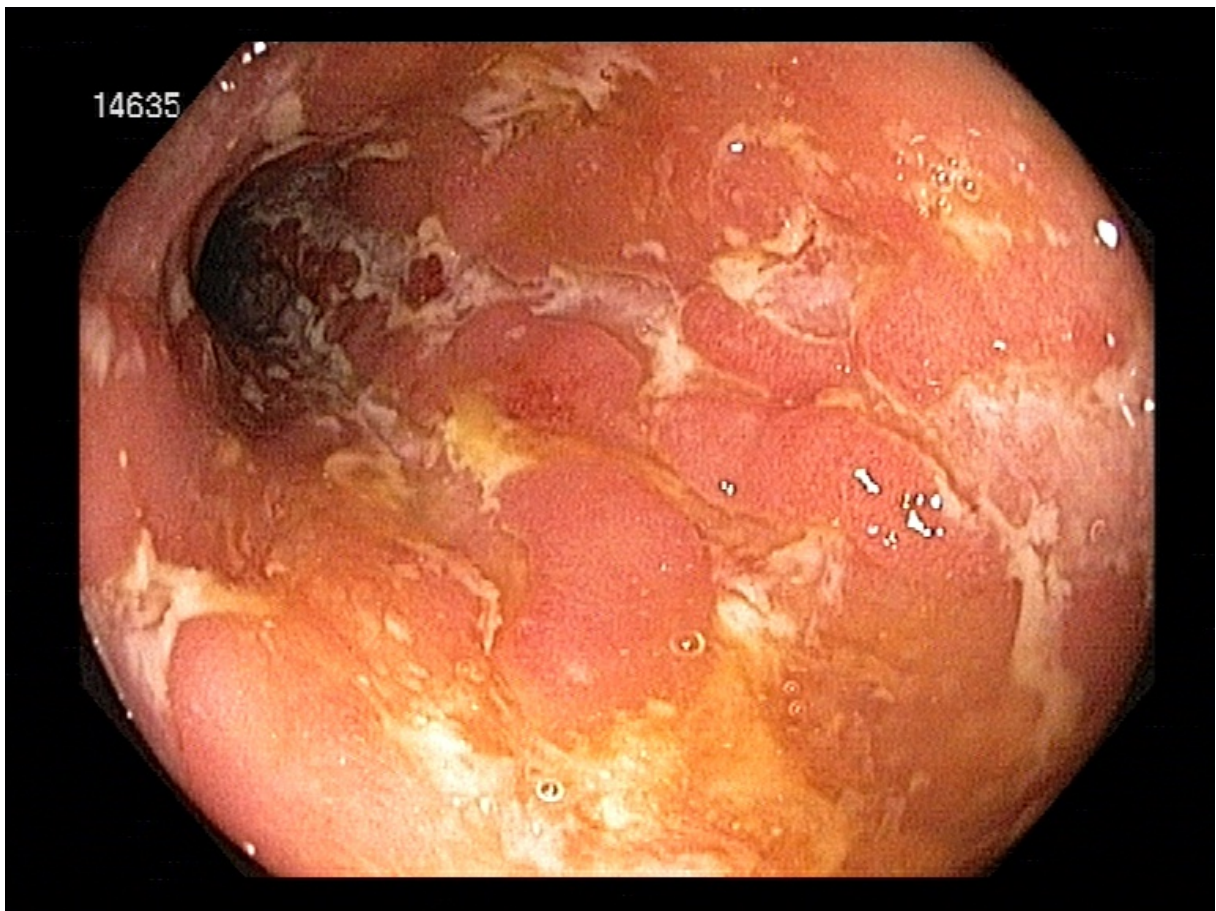


Abbildung 2: Endoskopisches Bild Morbus Crohn: typische Schneckenspuren („snail trails“), die durch längliche Ulzerationen in der Darmwand entstehen. Abteilung Gastroenterologie, Universitätsklinik Rostock

Durch den transmuralen Befall kommt es häufig zu Abszessen und Fisteln zur Haut und zu anderen Organen. Fibrosierungen der Darmwand können zu segmentalen Stenosen führen und die typische Haustrierung des Kolons aufheben, wodurch das Bild eines Gartenschlauchs (Gartenschlauchphänomen) entsteht. Durch ödematöse und fibrotische Verdickung der Darmwand kann es zu Stenosen kommen und durch verwachsene Darmabschnitte zu einem entzündlichen Konglomerattumor. Histologisch beobachtet man eine Häufung von Lymphozyten und Makrophagen. Charakteristisch für MC ist der histologische Nachweis von Granulomen (Lennard-Jones und Shivananda, 1997).

1.2.2 Colitis ulcerosa

CU beschränkt sich auf das Kolon, wobei eine kontinuierliche vom Rektum und distalen Kolon nach proximal abnehmende Entzündung typischerweise auftritt (**Abb.3**). Entzündungsaktivität um die Appendixmündung ist typisch und spricht nicht gegen eine C.ulcerosa. Die Genese einer sogenannten Backwash-Ileitis im Rahmen einer Pancolitis ist umstritten.

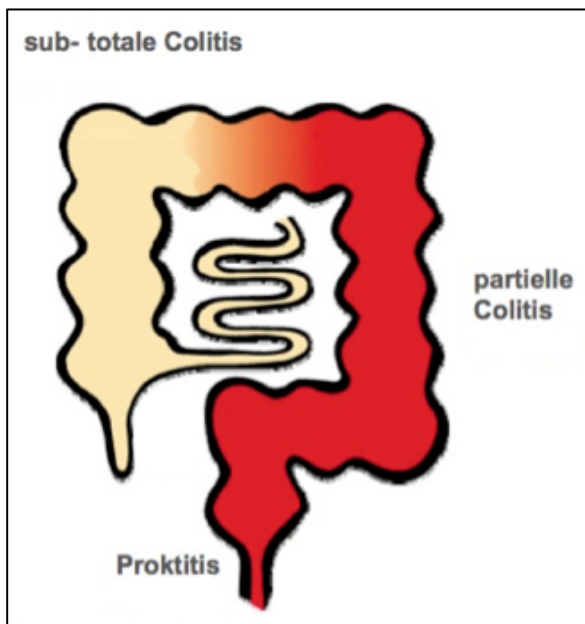


Abbildung 3: Befallsmuster Colitis ulcerosa: typische Manifestationsorte von CU im unteren Gastrointestinaltrakt.
Kompetenz-ced.eV

Im Gegensatz zu MC breitet sich die Entzündung kontinuierlich aus und ist auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) begrenzt. Wie beim MC verläuft die Krankheit schubweise mit beschwerdearmen Phasen der Remission und Rezidiven mit hoher Krankheitsaktivität. Die Krankheitsaktivität lässt sich z.B. mit dem Mayo-Score ermitteln (Schroeder et al., 1987). Klinisch zeigt sich eine schwere Diarrhoe mit unblutigen oder blut-schleimigen Durchfällen, die ernährungsabhängig und auch nachts auftreten können. Die Durchfälle gehen meist mit Tenesmen einher. Es kann je nach Schweregrad zu Fieber und im Verlauf zu einem Gewichtsverlust kommen. Das makroskopische Bild kann in milden Verläufen durch eine ödematöse Schwellung der Darmschleimhaut gekennzeichnet sein, in schweren Fällen zeigen sich Ulzerationen, die zu Blutungen und zu einem Verlust des Reliefs mit Schleimhautabflachung führen. Stehengebliebene Schleimhautareale imponieren dabei als Pseudopolypen (**Abb.4**).

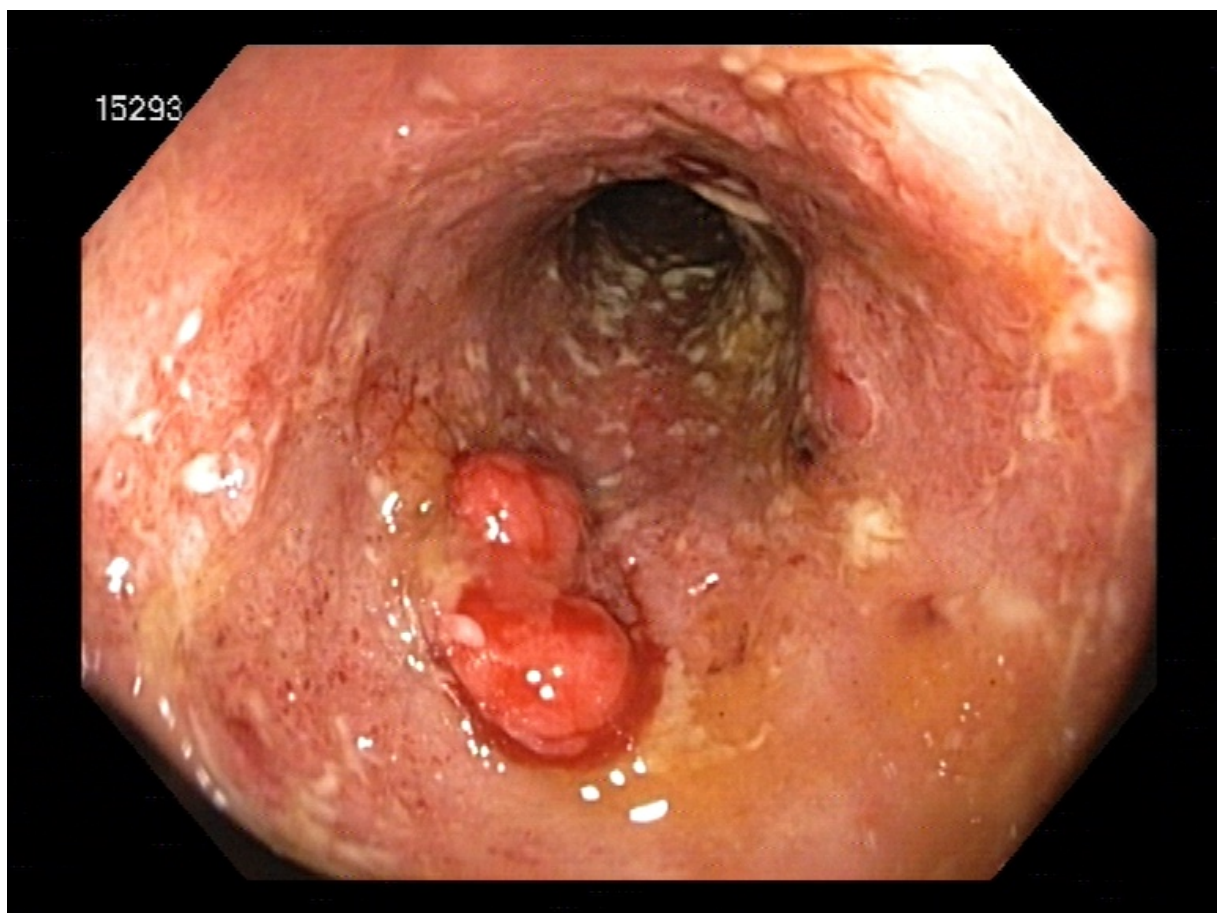


Abbildung 4: Endoskopisches Bild Colitis ulcerosa: entzündete und abgeflachte Darmschleimhaut in CU mit typischen Pseudopolypen. Abteilung Gastroenterologie, Universitätsklinik Rostock

Histologisch kommt es zu einer Atrophie der Schleimhaut mit Infiltration von Lymphozyten und Granulozyten und einer Verminderung von Becherzellen und Krypten. Typisch sind auch Kryptenabszesse.

1.3 Komplikationen

Typisch bei den CED ist die abdominelle Symptomatik. Die Erkrankung ist jedoch nicht nur auf den Gastrointestinaltrakt begrenzt, sondern zeigt auch in vielen Patienten extraintestinale Manifestationen an Gelenken, Augen, Haut und Leber (Podolsky et al., 2002). Die extraintestinalen Manifestationen können mit steigender Krankheitsaktivität auftreten oder ganz unabhängig vom Krankheitsverlauf (Rothfuss et al., 2006; Trikudanathan et al., 2012). Seltener können auch Lunge, Herz, Pankreas und das Gefäßsystem betroffen sein. Zusätzlich kann die Erkrankung zu einer Malabsorption, Osteoporose, peripheren Neuropathien und Nieren- und Gallensteinen führen. Im Vergleich zur gesunden Bevölkerung haben Patienten mit CU und wahrscheinlich auch Patienten mit kolonischem MC ein erhöhtes Risiko im Krankheitsverlauf ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Das Risiko ein Karzinom zu entwickeln steigt dabei mit Dauer und Schwere der Erkrankung und hängt mit der persistierenden Entzündung des Darms zusammen (Dyson et al., 2012). Daher ist bei langjährigem Krankheitsverlauf die Koloskopie Goldstandard zur Dysplasie-Überwachung.

1.4 Ätiologie

Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist nicht vollständig geklärt. Es werden verschiedene Faktoren diskutiert, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen könnten. Darunter sind genetische, mikrobielle und Umwelt-Faktoren, die zu einer beeinträchtigten mukosalen Immunabwehr, dysbiotischer Bakterienzusammensetzung und chronischen Entzündungsreaktion führen. Die einzelnen Faktoren sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.4.1 Genetische Faktoren

CED zeigen eine familiäre Häufung und viele der Erkrankten haben eine familiäre Vorbelastung, mit dem höchsten Risiko bei erkrankten Verwandten ersten Grades (Nunes et al., 2011). Eine internationale Studie über genetische Risikofaktoren für CED mit 75,000 MC und CU Patienten hat mehr als 160 Risikoloci identifiziert, die unter anderem bei der Interaktion von Bakterien mit dem intestinalen Immunsystem eine Rolle spielen (Jostins et al., 2012). Eine weitere aktuelle trans-ethnische Studie mit über 20,000 Individuen europäischer und nicht-europäischer Abstammung konnte zusätzlich 38 Risikoloci für CED identifizieren (Liu et al., 2015). Somit gibt es über 200 single-nucleotide polymorphisms (SNPs), die mit einem erhöhten Risiko einer Entwicklung von CED verbunden sind. Funktionen wie die intestinale Barrierefunktion, Wundheilung, Autophagie, Apoptose, Immunaktivierung und Stressreaktionen können hierdurch beeinflusst werden (Liu und Stappenbeck 2016; Van Limbergen et al., 2014; Jostins et al., 2012; Anderson et al., 2011; Franke et al., 2010).

Das nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2 (*NOD2*), auch *CARD15* genannt, war das erste Gen, das 2001 mit CED in Verbindung gebracht wurde (Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Die Entdeckung von *NOD2* und anderen Genen, die mit CED assoziiert werden, wie *ATG16L1*, *IRGM*, *CARD9* und *IL23R*, unterstreichen die Bedeutung der angeborenen und erworbenen Immunantworten auf Darmbakterien. Eine Veränderung der Funktion oder Expression dieser Gene können die Interaktionen zwischen Wirt und Darmbakterien stören und möglicherweise die Entwicklung der CED begünstigen (Cadwell et al., 2008; Kaser und Blumberg, 2011).

Mutationen im *NOD2*-Gen sind ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung eines MC (Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Mutationen im *NOD2* Gen wurden als erster genetischer Risikofaktor bei MC beschrieben (Hugot, Ogura). *NOD2* hat eine wichtige Bedeutung in der Regulation der kommensalen Darmbakterien im Mäusedarm, da *NOD2*-defiziente Mäuse eine Erhöhung der Bacteroidetes, Firmicutes und Bacilli im terminalen Ileum ausweisen und eine verminderte Fähigkeit zeigten, das pathogene Bakterium *Helicobacter hepaticus* zu entfernen (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). Eine andere Studie konnte in intestinalen Biopsien von CED Patienten, eine Verbindung zwischen der Anzahl der *NOD2* Risikoallele und einer gesteigerten Menge an Enterobacteriaceae nachweisen (Knights et al., 2014). Das *NOD2*-Gen kodiert für ein Protein, das als intrazellulärer Rezeptor für Bakterienbestandteile in Antigen-präsentierenden Zellen wirkt

und somit eine Verbindung zwischen intestinaler Bakterienzusammensetzung und Immunsystem darstellen könnte. Die genaue Funktion von *NOD2* und dessen Auswirkung bei Mutation auf die Entwicklung von MC sind noch nicht vollständig geklärt (Corridoni et al., 2014; Saleh und Trinchieri, 2011). Muramyl-Dipeptid wurde als Ligand des *NOD2* Rezeptors beschrieben (Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003). Weiterhin erkennt der Rezeptor auch Peptidoglykan, was ein Bestandteil der Bakterienwand ist (Strober et al., 2006; Volz et al., 2010). Die Aktivierung des *NOD2* mit Muramyl-Dipeptid induziert Autophagie in Dendritischen Zellen (DC) (Cooney et al., 2010). *NOD2* wird in Makrophagen, dendritischen Zellen, intestinalen Epithelzellen und Paneth-Zellen exprimiert (Abb.5).

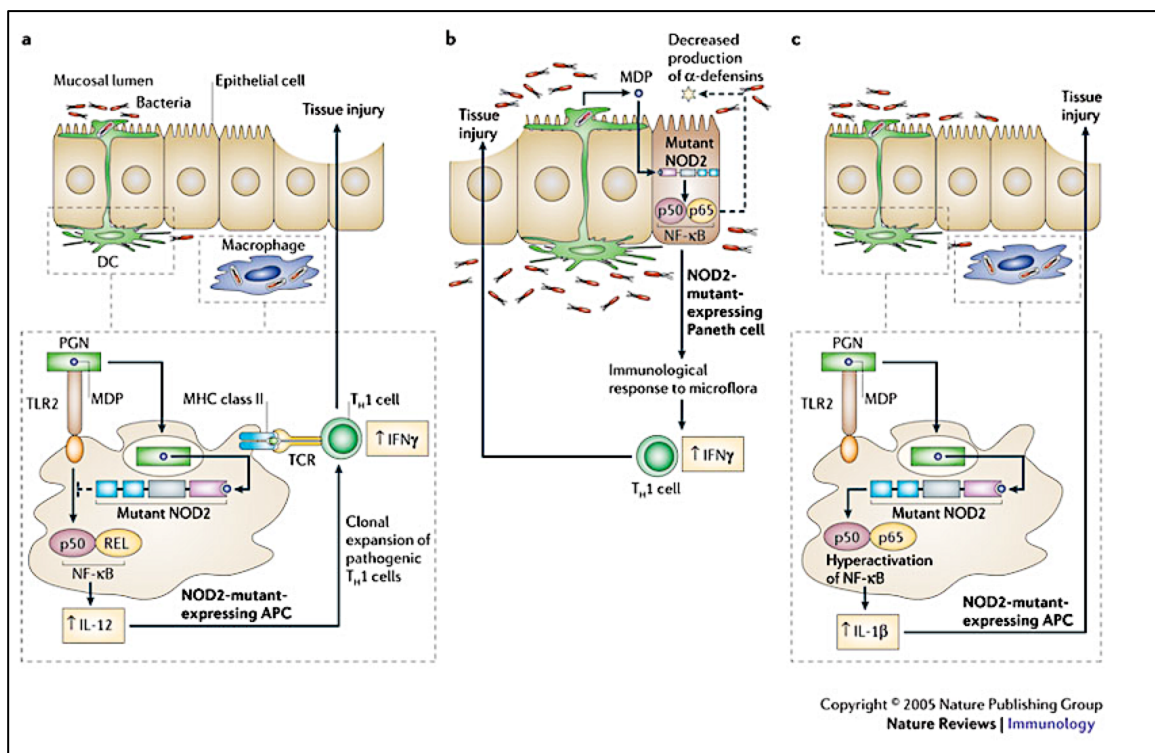


Abbildung 5: Mögliche Interaktionen der *NOD2* Mutation in MC. (Strober et al., 2006)

a) Peptidoglykan (PGN), Bestandteil der Bakterienzellwand, aktiviert über Bindung des Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und über *NOD2* die Antigen-präsentierenden Zellen (DC und Makrophagen). In Mukosa mit normaler Expression von nicht-mutiertem *NOD2* wird die durch TLR2 induzierte Aktivierung des Nukleären Faktor-κB (NF- κB) negativ durch die Aktivierung von *NOD2* reguliert. Es kommt daher zu keiner exzessiven Bildung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Interferon-γ (IFNγ), die über die T-Helfer 1 (T_H1) Zellen die Immunantwort steuern. In Mukosa mit mutiertem *NOD2* Gen wird die PGN vermittelte Aktivierung von NF- κB über TLR2 nicht negativ reguliert, wodurch eine T_H1-Zellen vermittelte Inflammation in MC entstehen kann. b) Dendritische Zellen in der Lamina propria können über Dendriten kommensale Bakterien aus dem Darmlumen aufnehmen, um den *NOD2* Liganden Muramyl Dipeptid (MDP) zu bilden. Durch Diffusion des MDP in Paneth Zellen kann *NOD2* aktiviert werden und es kommt zu einer Sekretion des antimikrobiellen Peptids α-Defensin. In Mukosa mit nichtmutiertem *NOD2* kann die kommensale Bakterienpopulation herabreguliert werden und es entsteht keine Inflammation. In Mukosa mit *NOD2* Mutation kommt es durch die verminderte α-Defensin Produktion zu einer bakteriellen Überwucherung, die zu einer Inflammation führt. c) In Antigen-präsentierenden Zellen (APC) welche eine *NOD2* Mutation aufweisen, führt MDP zu einer exzessiven IL-1β Produktion statt einer IL-12 Produktion, was wiederum eine Inflammation begünstigt. (nach Strober et al. 2006)

Die Mutationen im *NOD2*-Gen werden unabhängig von MC auch mit anderen Erkrankungen wie Graft-versus-Host-Disease (GvHD) (Holler et al., 2004; Holler et al., 2008; van der Velden et al., 2009), Septikämien (Brenmoehl et al., 2007), spontaner Peritonitis bei Leberzirrhose (Appenrodt et al., 2010), Komplikationen nach Darmtransplantation (Fishbein et al., 2008) und Entwicklung eines Kurzdarmsyndroms in Abwesenheit von MC (Schäffler et al., 2013) in Verbindung gebracht. Das *NOD2* vermittelte Ungleichgewicht der Darmflora kann auch das Risiko für eine Kolitis und eine Kolitis-assoziierten Karzinogenese im Mausmodell erhöhen (Couturier-Maillard et al., 2013). Einige Studien zeigten eine Verbindung zwischen bestimmten MC-assoziierten Mutationen des *NOD2*-Gens und einer verringerten Expression antimikrobieller Peptiden aus Panethzellen in Patienten mit MC im terminalen Ileum (Zasloff, 2002; Wehkamp et al., 2005). In einer Studie mit *NOD2*-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Anzahl an kommensaler Darmflora beobachtet werden und den Einfluss von *NOD2* auf die Bakterienzusammensetzung zeigen (Rehman et al., 2011). Darmbakterien scheinen auch die Expression des *NOD2*-Gens zu beeinflussen, da keimfreie Mäuse eine verringerte *NOD2* Expression im terminalen Ileum aufweisen, welche nach Rekolonialisierung der Maus mit Darmbakterien reversibel war (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). In der Mehrheit der Fälle ist die genetische Suszeptibilität jedoch nicht ausreichend, um die Entstehung von CED zu erklären. Sogar unter monozygoten (identischen) Zwillingen, bei denen die Übereinstimmung für MC zwischen 35% und 38% und bei CU zwischen 16% und 18,5% liegt, zeigt sich keine 100% Penetranz für CED (Orholm et al., 2000; Halfvarson et al., 2003; Spehlmann et al., 2008). Deswegen scheinen nicht-genetische Faktoren wie das Darmmikrobiom und Umwelteinflüsse ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CED zu spielen.

1.4.2 Das Mikrobiom

CED sind hauptsächlich im terminalen Ileum und Kolon lokalisiert, wo sich die größte und vielfältigste Bakteriengemeinschaft des menschlichen Organismus befindet (Seksik und Landman, 2015). Neben mehr als 1000 verschiedenen Bakterienspezies sind auch Archaea, Eukaryoten, Viren, Pilze und Bakteriophagen im Darm angesiedelt und bilden die Darmflora (Sonnenburg et al., 2004). Die Gesamtanzahl der Mikroorganismen im menschlichen Darm wird auf 10^{14} geschätzt und übersteigt die Zahl der Zellen im menschlichen Körper um das zehnfache (Qin et al., 2010). Die Gesamtheit der mikrobiellen Genome wird als das Mikrobiom

bezeichnet und enthält schätzungsweise um den Faktor 100 mehr Gene als das gesamte menschliche Genom (Ley et al., 2006). Die individuelle bakterielle Komposition setzt sich primär bei der Geburt und im Laufe des ersten Lebensjahres zusammen. Darmbakterien erfüllen eine Vielzahl von metabolischen Funktionen. Sie können Vitamine produzieren, essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren synthetisieren und die Biotransformation von Galle ausführen (Vyas und Ranganathan, 2012). Die normale menschliche bakterielle Zusammensetzung im Darm besteht hauptsächlich aus Spezies aus den vier großen Bakterienabteilungen: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, und *Actinobacteria* (Qin et al., 2010; Frank et al., 2007). Eine Rolle der Darmbakterien in der Pathogenese der CED wurde schon früh vermutet, jedoch konnte bisher kein einzelner bakterieller Vertreter für die Verursachung der CED verantwortlich gemacht werden (Kirsner, 1988). Dennoch sind die CED klar mit einem Zustand der intestinalen Dysbiose assoziiert, einem Ungleichgewicht der bakteriellen Zusammensetzung und Funktionen im Darm, welches die Wirt-Darmbakterien- und Immun-Homöostase stört (Seksik et al., 2003; Ott et al., 2004; Manichanh et al., 2006; Gophna et al., 2006; Frank et al., 2007).

Die intestinale Dysbiose kann durch Verlust von gesundheitsfördernden oder Zunahme der krankheitsfördernden Bakterien zur Pathogenese der CED beitragen. Verschiedene Störungen in der Bakterienerkennung (*NOD2*), der Autophagie, des endoplasmatischen Retikulum-Stresses und der Monozytenfunktion (Courth et al., 2015) führen zu einer Störung der antimikrobiellen Abwehr und Veränderung des Mikrobioms (Van Dussen et al., 2014; Wehkamp und Stange, 2010). Der kommensalen Mikroflora wird mittlerweile als Auslöser und Unterhalter eines chronischen Entzündungsprozesses eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung der CED zugesprochen (Duchmann et al., 1999; Moussata et al., 2011; Wehkamp et al., 2005). Das intestinale Immunsystem muss pathogene Keime abwehren und gleichzeitig einen Zustand der Immuntoleranz mit der residenten intestinalen Flora einhalten. Dysbiotische Zustände führen zu einem Überwiegen der pathogenen Bakterien, die die epitheliale Barriere schädigen. Die in die Mukosa eindringenden Bakterien führen zu einer Entzündungsreaktion, bei der dann verschiedene Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (T-Zellen) eine entscheidende Rolle spielen (Zundler und Neurath, 2015; Lord, 2015). In Mausmodellen konnte ein Zusammenhang zwischen Störung dieser Balance und einer Entzündung des Darms nachgewiesen werden (Abraham und Medzhitov, 2011).

Die chronische Aktivierung des intestinalen Immunsystems durch die Darmflora kann in genetisch prädisponierten Individuen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der CED spielen

(Sartor, 2008; Abraham und Cho, 2009; Frank et al., 2011). Eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und immunaktiven Zellen, wie B- und T-Zellen sind an diesem Prozess beteiligt. Verschiedene Studien zeigten einen starken Unterschied der Darmflora zwischen CED Patienten und gesunden Kontrollen und charakterisierten die verringerte Bakterienfülle und Diversität als Zustand der Dysbiose (Kostic et al., 2014; Manichanh et al., 2012; Nagalingam und Lynch, 2012). Dabei finden sich in CED Patienten vor allem in und direkt auf dem Schleimhautepithel mehr Bakterien als bei Gesunden (Kleessen et al., 2002; Swidsinski et al., 2002). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die meisten CED-ähnlichen Symptome unter Antibiotikagabe und keimfreien Zuständen verringert oder aufgehoben waren und bei einer darauffolgenden Kolonisierung wieder auftraten oder sich verschlechterten (Rakoff-Nahoum et al., 2002; Rath et al., 2001; Sadlack et al., 1993; Taurog et al., 1994). Diese Veränderungen unter keimfreien und kolonisierten Zuständen unterstützen die Annahme einer Beteiligung der Darmbakterien bei den CED. Einen positiven Effekt auf die Remission in CED konnte auch unter Antibiotikatherapie gezeigt werden (Khan et al., 2011). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die chirurgische Stuhlableitung das klinische Ergebnis einiger CED Patienten verbesserte (Rehg et al., 2009; Yamamoto et al., 2000; Rutgeerts et al., 1991). Verschiedene Studien konnten eine Veränderung der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung bei CED-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen zeigen (Frank et al., 2007; Willing et al., 2010; Frank et al., 2011). Die intestinale Darmflora kann daher eine wichtige Bedeutung für die Pathogenese der CED haben (Manichanh et al., 2012). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass MC Patienten eine verringerte Menge an sogenannten potenziell benefiziellen Bakterien, wie *Bifidobacteria* und *Lactobacilli*, und eine erhöhte Menge an potentiell pathogenen Bakterien, wie *Escheria coli*, haben (Favier et al., 1997; Darfeuille-Michaud et al., 1998; Ott et al., 2004; Backhed et al., 2005; Frank et al., 2007; Sartor, 2008; Neish, 2009; Willing et al., 2009; Arumugam et al., 2011; Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Martinez-Medina and Garcia-Gil, 2014). Jedoch wurde in einer anderen Studie eine erhöhte Anzahl an *Bifidobacteria* und *Lactobacilli* aufgezeigt (Wang et al., 2014). Eine reduzierte Anzahl der Butyrat-produzierenden *Roseburia hominis* und *Faecalibacterium prausnitzii* konnte in Stuhlproben von CU Patienten beobachtet werden (Machiels et al., 2014). Bei Patienten mit aktiver CED war *Faecalibacterium prausnitzii* signifikant gegenüber den gesunden Kontrollgruppen verringert (Swidsinski et al., 2008; Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009). Es konnte auch das anti-inflammatorische Potential dieser Spezies und dessen Reduktion in

Stuhlproben von aktiven CED Patienten gezeigt werden. Eine andere Studie zeigte eine Reduktion von *Clostridium gamly* bei aktiver CU und sowohl bei aktivem als auch bei inaktivem MC, sowie eine Erhöhung der *Bacteroides* in MC (Andoh et al., 2011). CED Patienten weisen eine Reduktion der kommensalen Bakterien *Bacteroidetes* und *Lachnospiraceae* (Frank et al., 2007) und eine geringere Vielfalt der Bakteriengemeinschaft auf (Ott et al., 2004; Dicksved et al., 2008; Nishikawa et al., 2009). Eine andere Studie konnte eine erhöhte Anzahl an *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* und eine Reduktion der *Clostridia* in Biopsien von MC Patienten aufzeigen (Gophna et al., 2006). Eine Analyse der Mukosa-assoziierten Darmbakterien aus ilealen und rektalen Biopsie aus neu diagnostizierten pädiatrischen MC Patienten zeigte eine Vermehrung der *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* und *Fusubacteriaceae* und eine Reduzierung der *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* und *Clostridias IV* und *XIVa* (Gevers et al., 2014) (**Abb.6**).

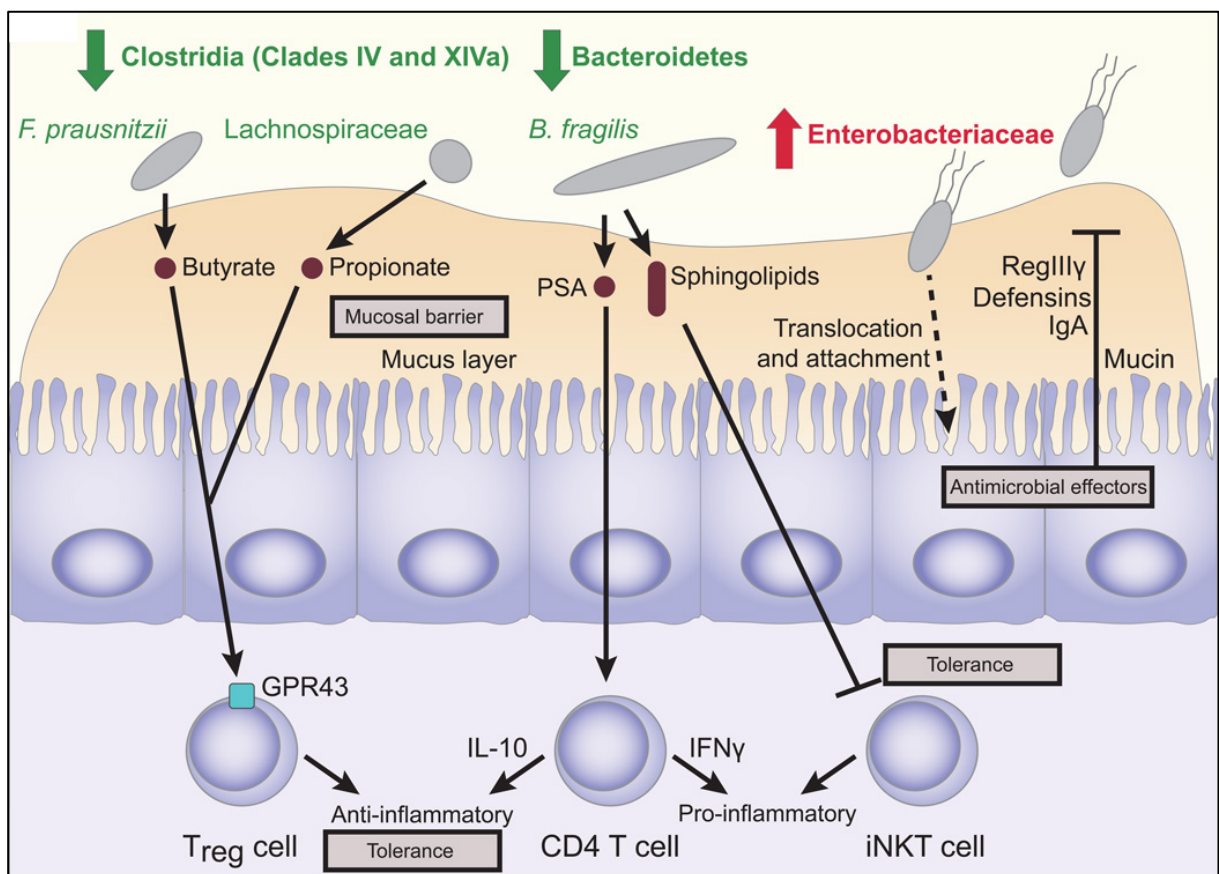


Abbildung 6: Interaktionen zwischen Darmflora und intestinaler Mukosa in CED. (Gevers et al., 2014)

Typische Veränderungen in der intestinalen Bakterienzusammensetzung in CED (Verminderung *Clostridia* und *Bacteroidetes* sowie Vermehrung der *Enterobacteriaceae*) mit den funktionellen Konsequenzen und Reaktionen der Mukosa auf diese Dysbiose. Bakteriell produzierte Butyrat und Propionat regulieren GP43 abhängig die Funktion und Expansion der regulatorischen T-Zellen. Polysaccharid A (PSA) zeigt CD4+ T-Zellen vermittelt

antiinflammatorische oder proinflammatorische Effekte. Sphingolipide hemmen eine exzessive Aktivierung der Natürlichen Killer T-Zellen. Luminale IgA- Reaktionen auf die Dysbiose. (nach Gevers et al., 2014)

Der Metabolismus der Darmbakterien kann zur Pathogenese der CED beitragen oder eine protektive Wirkung haben. Kurzkettige Fettsäuren die von intestinalen Bakterien aus Ballaststoffen (nicht resorbierten Kohlenhydraten) gebildet werden, sind ein wichtiger Mediator für die intestinale Homöostase. Es konnte gezeigt werden, dass kurzkettige Fettsäuren häufig in CED stark vermindert sind (Machiels et al., 2014; Vital et al., 2013). Die Bindung von kurzkettigen Fettsäuren an den G-protein gekoppelten Rezeptor 43 (GPR43) ist für die Ausführung von inflammatorischen Reaktionen nötig (Maslowski et al., 2009). Kurzkettige Fettsäure- produzierende Bakterien der *Clostridien Gruppe IV, XIVa* und *XVII* induzieren die Differenzierung, Expansion und Funktion der regulatorischen T- Zellen im Kolon (Atarashi et al., 2011; Atarashi et al., 2013). Kurzkettige Fettsäuren können GPR43- abhängig die Anzahl und Funktion der regulatorischen T-Zellen im Kolon regulieren (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013; Smith et al., 2013). Daher kann es durch ballaststoffarme Diät oder eine durch Dysbiose induzierte Verminderung der Produktion der kurzkettigen Fettsäuren zu einer gestörten Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen kommen und dies zur Schwere der CED beitragen. Ein anderes bakterielles Produkt, welches einen positiven Effekt auf die Funktion des Immunsystems hat ist Polysaccharid A (PSA), welches von *Bacteroides fragilis* gebildet wird (Mazmanian et al., 2005). PSA interagiert mit TLR2 auf antigenpräsentierenden Zellen und wird vom MHC II Komplex bearbeitet und präsentiert, um CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren (Round et al., 2011). Dies kann über IL-10 Sekretion zur Immunprotektion oder über IFN γ Sekretion zu proinflammatorischen Reaktionen führen (Dasgupta und Kaspar, 2013). Auch Sphingolipide, die von *Bacteroides fragilis* produziert werden, haben immunmodulatorische Funktionen. Sphingolipide können die intestinalen Natürlichen Killer (NK) T-Zellen regulieren und deren exzessive Aktivierung bei induzierter experimenteller Kolitis verhindern und dadurch zu der Aufrechterhaltung der Immunbalance beitragen (An et al., 2014). In einigen Studien konnte der Einfluss von Bakterien, besonders *Enterobacteriaceae*, auf die intestinale IgA-Sekretion gezeigt werden (Kau et al., 2015; Moon et al., 2015). Es wurde beschrieben, dass Mäuse mit niedrigen IgA-Spiegeln empfänglicher für induzierbare Kolitiden sind als Mäuse mit hohen IgA-Spiegeln. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die CED assoziierte Dysbiose Ursache oder Folge dieser Erkrankung ist.

1.4.3 Umweltfaktoren

Besonders in industrialisierten Ländern konnte im letzten Jahrhundert ein starker Anstieg in Inzidenz und Prävalenz der CED verzeichnet werden (Molodecky et al., 2012). Dies kann mit der starken Veränderung von Hygiene, Diät, Umwelt und Lebensstil in Verbindung gebracht werden. Auch die Anwendung von Antibiotika hat stark zugenommen und wird mit der Entwicklung von CED in Verbindung gebracht (Hviid et al., 2001; Virta et al., 2012; Kronman et al., 2012). Umweltfaktoren, wie etwa Rauchen, Diät und Stress spielen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung von CED (Ananthakrishnan, 2015). Der Wandel der Ernährungsgewohnheiten gehört zu den größten Veränderungen, die mit Industrialisierung einhergehen. Es werden täglich mehr Kalorien aufgenommen, Fette und Zucker haben einen größeren Anteil in der Ernährung als komplexe Kohlenhydrate und Ballaststoffe. In einer Studie konnte bei fettreicher und ballaststoffarmer Diät im Vergleich mit fettarmer und ballaststoffreicher Diät eine starke Veränderung der Darmbakterienzusammensetzung gezeigt werden (Wu et al., 2011). Eine Studie, welche afrikanische Kinder mit ballaststoffreicher pflanzenbasierter Diät mit europäischen Kindern mit fett-, zucker- und proteinreicher Diät verglich, konnte eine stark unterschiedliche Bakterienzusammensetzung zwischen den beiden Ernährungsstilen aufzeigen (De Filippo et al., 2010). Eine überwiegend fleischbasierte Ernährung kann ebenfalls die Darmflora stark beeinflussen (David et al., 2014).

Auch eine Verbesserung der hygienischen Standards wird mit der Zunahme der Inzidenz und Prävalenz der CED assoziiert. Es wird vermutet, dass ein Fehlen von wichtigen mikrobiellen Reizen, die für die Entwicklung des Immunsystems nötig sind, mit einer reduzierten Diversität der Darmflora und einer veränderten Wirt-Bakterien Interaktion einhergehen kann, was wiederum das Auftreten von CED begünstigen kann (Wills-Karp et al., 2001). Dies wird unterstützt von einer indischen Studie, die einen begünstigenden Einfluss von städtischem Leben mit sicherem Trinkwasser und einen protektiven Einfluss des Vorhandenseins von Vieh auf dem Hausgelände für die Entwicklung von MC aufzeigt (Pugazhendhi et al., 2011).

Tabakkonsum hat ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung von CED. Rauchen scheint das Risiko für MC zu steigern, wobei es bei CU eher ein protektiver Faktor ist (Calkins, 1989).

1.5 Diagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt anhand des klinischen Beschwerdebildes in Kombination mit der Endoskopie (einschließlich Histologie), Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren. Laborchemische Abweichungen wie Anämiezeichen, Hypoalbuminämie, erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und C-reaktives Protein können die Diagnosefindung unterstützen, sind jedoch nicht spezifisch für CED. Computer Tomographie, Magnetresonanzen-Enterographie und Kapselendoskopie können genutzt werden, um endoskopisch nicht-erreichbare Darmabschnitte zu beurteilen. Die Abgrenzung der CED gegeneinander und zu anderen Darmerkrankungen ist schwer und kann gelegentlich erst durch eine Verlaufsbeurteilung möglich werden.

1.6 Therapie

Der natürliche Verlauf der CED ist sehr variabel. Die medikamentöse Therapie richtet sich dabei nach Remissionsinduktion bei schubweisem Verlauf und Remissionserhaltung, sowie nach Schwere und Lokalisation. Die medikamentöse Therapie ist bei MC und CU ähnlich, unterscheidet sich jedoch in einzelnen Punkten. Zur Verfügung stehen Kortikosteroide, anti-inflammatorische Substanzen (5-ASA-Präparate), immunsuppressive Medikamente (Azathioprin/6-Mercaptopurin, Methorexat) und Tumor Nekrose Faktor-Antikörper. Als neuer Therapieansatz kam in den letzten Jahren der integrinbasierte Antikörper Vedolizumab auf den Markt. Weitere Medikamente stehen kurz vor der Zulassung (z.B. Ustekinumab, Tofacitinib etc).

Durch medikamentöse Therapie ist keine Heilung der CED zu erreichen. Es kann jedoch ein Zustand der Remission mit reduzierter Symptomatik und reduzierter intestinaler Entzündung erreicht werden. Übergeordnetes Therapieziel ist bei beiden Krankheitsentitäten eine steroidfreie Remission.

Trotz der guten pharmakologischen Therapiemöglichkeiten sprechen einige CED Patienten nicht langfristig auf die Therapie an. Bei Therapierefraktarität kann meist nur eine chirurgische Behandlung helfen.

Ungefähr 50% der MC Patienten benötigen innerhalb von 5 Jahren und 80% innerhalb von 10 Jahren nach Diagnosestellung eine chirurgische Intervention (Farmer et al., 1985; Bernell et al., 2000; Toh et al., 2016), da es im Krankheitsverlauf zu Darmstenosen bei entzündlicher

Obstruktion, Abszedierung und Fistelung zur Haut, zur Harnblase oder interenterisch kommen kann. Die operative Therapie ist zwar nicht kurativ, kann aber eine Option bei MC Patienten mit Komplikationen und bei einem Nichtansprechen der medikamentösen Behandlung sein. Die chirurgische Intervention ist dabei rein symptomatisch. Häufig kommt es nach Resektion des befallenen Darmabschnitts in benachbarten Darmanteilen zu Rezidiven, die einen weiteren chirurgischen Eingriff nötig macht (Hultén, 1988).

Das einzige kurative Verfahren bei CU ist die Proktokolektomie. 20-30% der CU Patienten, bei denen keine Remission unter medikamentöser Behandlung zu erreichen ist, benötigen eine chirurgische Intervention (Solberg et al., 2009).

1.6.1 TNF- α -Blocker

In der vorliegenden Studie wurde auch eine mögliche Veränderung der Darmflora bei Behandlung mit TNF- α -Blockern (Infliximab (IFX) und Adalimumab (ADA)) untersucht. 4 TNF- α -Blocker sind weltweit für die Therapie von CED zugelassen: Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab pegol. Golimumab ist nur bei CU zugelassen, Certolizumab ist in Deutschland nicht zugelassen. Die TNF- α -Blocker IFX und ADA sind monoklonale Immunglobulin (Ig) G1 anti-TNF Antikörper. Ein IgG Antikörper besteht aus zwei Antigen-bindenden Fab Domänen, die an ein glycosylierte Fc Region gebunden sind, welche die immunologischen Funktionen vermittelt (Benucciet al., 2012) (**Abb.7**).

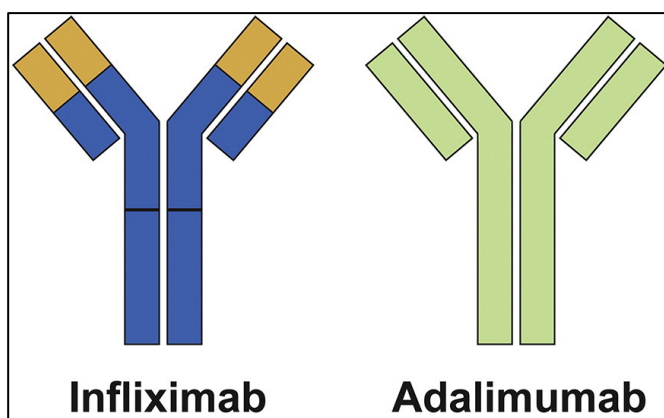


Abbildung 7: Struktur der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Antikörper IFX und ADA. (modifiziert nach Olesen et al., 2016)

IFX ist ein chimärer (25% Maus und 75% Mensch) monoklonaler anti-Tnf Antikörper, bei dem die Fab-Region (gelber Abschnitt) von der Maus stammt. ADA ist ein rein humaner monoklonaler anti-Tnf Antikörper. (Olesen et al., 2016)

Der Tumor Nekrose Faktor ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das eine normale inflammatorische Reaktion auf Mikroben und Gewebsdefekte vermittelt (Brown und Mayer, 2007) und wird hauptsächlich von Lymphozyten und Makrophagen gebildet (Peake et al., 2013). Patienten mit aktiver CED zeigen eine erhöhte Konzentration von TNF in Schleimhaut, Serum und Stuhl (MacDonald et al., 1990; Breese et al., 1994; Murch et al., 1991; Nielsen et al., 1999). TNF existiert in einer Membran gebundenen (tmTNF) und einer löslichen Form (sTNF), die ihre Wirkung über Bindung an den TNF-Rezeptor 1 oder TNF-Rezeptor 2 vermitteln (Tracey et al., 2008). Die Einleitung des TNF- Signalwegs führt zu einer Expression von proinflammatorischen und anti-apoptotischen Genen über mitogen-vermittelte Proteinkinasen und den Nukleären Faktor- κ B (Chu, 2013). Zusammenfassend führt TNF zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort durch erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon- γ , TNF und IL-1 β , Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen inflammatorischen Mediatoren und zu Rekrutierung, Aktivierung, Differenzierung und Proliferation verschiedener Immunzellen (Agnholt und Kaltof 2001; Ljung et al., 2007; Olsen et al., 2009; Mizutani et al., 2011). In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte durch Blockierung des TNF-Rezeptors oder durch Bindung eines TNF- α -Blockers an das membrangebundene tmTNF und Einleitung des „reverse signaling“ eine Supprimierung der proinflammatorischen Mediatoren und folglich eine Hemmung der chronischen Entzündung durch Rekrutierung inflammatorischer Zellen gezeigt werden, was einen positiven Nutzen in der Behandlung von CED hat (Olesen et al., 2009; Rutella et al., 2011; Nielsen und Ainsworth, 2013; Peake et al., 2013).

Über „reverse signaling“ durch Bindung von TNF- α -Blocker an tmTNF induzieren TNF- α -Blocker eine verminderte LPS (Lipopolysaccharid)- vermittelte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 β und IL-6 in Monozyten (Kirchner et al., 2004; Ringheanu et al., 2004; Meusch et al., 2009). IFX und ADA führten zur Apoptose und verminderter Bildung von IL-10 und IL12 in LPS- stimulierten Monozyten (Shen et al., 2005; Mitoma et al., 2005). Diese Ergebnisse sind insofern bedeutend, da angenommen wird, dass mikrobielle Produkte eine wichtige Rolle in der CED Pathogenese spielen. Ein weiterer Effekt des „reverse signaling“ ist die verminderte Produktion des proinflammatorischen IL-6 durch Ausschüttung des transformierenden Wachstumsfaktor beta (TGF- β) von Makrophagen (Derer et al., 2013). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist die TNFR2 Expression in aktivierten Lamina propria T-Zellen (LPTC) von MC-Patienten hochreguliert (Holtmann et al., 2002). Dieselbe Studie konnte eine verminderte Apoptoserate von LPTC bei überexprimierten

TNFR2 in T-Zellen und damit eine stärkere Kolitis im Mausmodell nachweisen. Durch Blockierung der tmTNF- vermittelten TNFR2 Aktivierung kann eine Apoptose von LPCT in CED-Patienten herbeigeführt werden (Atreya et al., 2011). Eine klinisches Therapieansprechen von MC Patienten durch T-Zell Apoptose konnte mit einer Behandlung mit TNF- α -Blockern in Verbindung gebracht werden (Van den Brande et al., 2007).

In CED Patienten besteht eine verringerte Funktion der Mukosaschranke und somit eine erhöhte intestinale Permeabilität für Antigene, die mit einer erhöhten Schleimhautentzündung einhergeht (Dignass, 2001; Mankertz und Schulzke, 2007). TNF führt zu einer Apoptose von intestinalen Epithelzellen (IEC) und ist somit bedeutend für den Defekt der Mukosaschranke (Inagaki-Ohara et al., 2001; Nunes et al., 2014). Auch eine TNFR2 vermittelte Erhöhung der Tight junction Permeabilität konnte beobachtet werden (Shen et al., 2006; Liu et al., 2011). Studien konnten eine Wiederherstellung der intestinalen Permeabilität und eine verbesserte Mukosaheilung unter Therapie mit einem TNF- α -Blocker zeigen (Suenae et al., 2002; Toedter et al., 2012; Ungar et al., 2016). Eine TNF- α -Blocker induzierte Mukosaheilung in MC Patientin korreliert mit einer verringerten Expression von IL-17 und IL-21 und einer verminderten Mukosainfiltration durch Makrophagen und CD4⁺T-Zellen (Caprioli et al., 2013; Liu et al., 2013). Die TNF- α -Blocker Therapie führt auch zu einer verminderten intestinalen Permeabilität durch Hemmung der erhöhten Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen, wie sie in CED vorkommt, und vermindert somit die Proteolyse der Extrazellulärmatrix und fördert die Mukosaheilung (Di Sabatino et al., 2007; Meijer et al., 2007). Die TNF- α -Blocker vermittelte Mukosaheilung wird auch durch regulatorische Makrophagen, die immunmodulatorische Eigenschaften besitzen und antiinflammatorische Zytokine bilden, gefördert (Vos et al., 2012).

In einigen Studien konnte die antiinflammatorische Bedeutung der regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden, welche die Proliferation von Effektor-T-Zellen und die Bildung proinflammatorischer Zytokine unterdrücken (Valencia et al., 2006; Veltkamp et al., 2011). TNF blockt die hemmende Wirkung der regulatorischen T-Zellen über den TNFR2 vermittelten Signalweg und eine verminderte Anzahl an zirkulierenden regulatorischen T-Zellen in MC Patienten geht damit einher (Valencia et al., 2006; Nagar et al., 2010). CED Patienten haben verminderte zirkulierende regulatorische T-Zellen und ein Anstieg der peripheren regulatorischen T-Zellen und die Wiederherstellung ihrer Wirkung bei CED Patienten mit TNF- α -Blocker Behandlung konnte beobachtet werden (Veltkamp et al., 2011; Guidi et al., 2013).

Durch die strukturellen Eigenschaften von IFX und ADA können die TNF- α -Blocker über ihre Fc Regionen die Antikörper- abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und Komplement- abhängige Zytotoxizität (CDC) auslösen und stellen damit eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Wirkung von TNF- α -Blocker dar (Scallon et al., 1995; Arora et al., 2009; Kaymakcalan et al., 2009; Ueda et al., 2013). ADCC ist eine durch natürliche Killerzellen vermittelte Zelllyse. Natürliche Killerzellen binden dabei mit ihrem Fc γ IIIa Rezeptor an die Fc Region der IgG1 Antikörpern, die über tmTNF an Zellen gebunden sind. Ebenfalls in einer Zelllyse resultierend, ist die Bindung der Fc Region an den Komplementfaktor C1q und die Einleitung der Komplementkaskade (Arora et al., 2009). Es gibt jedoch auch Patienten, bei denen sich keine Besserung unter Behandlung mit einem TNF- α -Blocker einstellt, sogenannte „non-responder“. Bis zu 30% der Patienten reagieren nicht auf die TNF- α -Blocker Behandlung und bis zu 50% zeigen nach initialer Besserung unter TNF- α -Blockern eine Verringerung der Wirkung (Nielsen und Ainsworth, 2013; Steenholdt et al., 2016). Abbildung 8 und 9 zeigen die Mechanismen der TNF- α -Blocker Wirkung durch Blockierung der TNF vermittelten Aktivierung der TNF-Rezeptoren und durch tmTNF-Bindung.

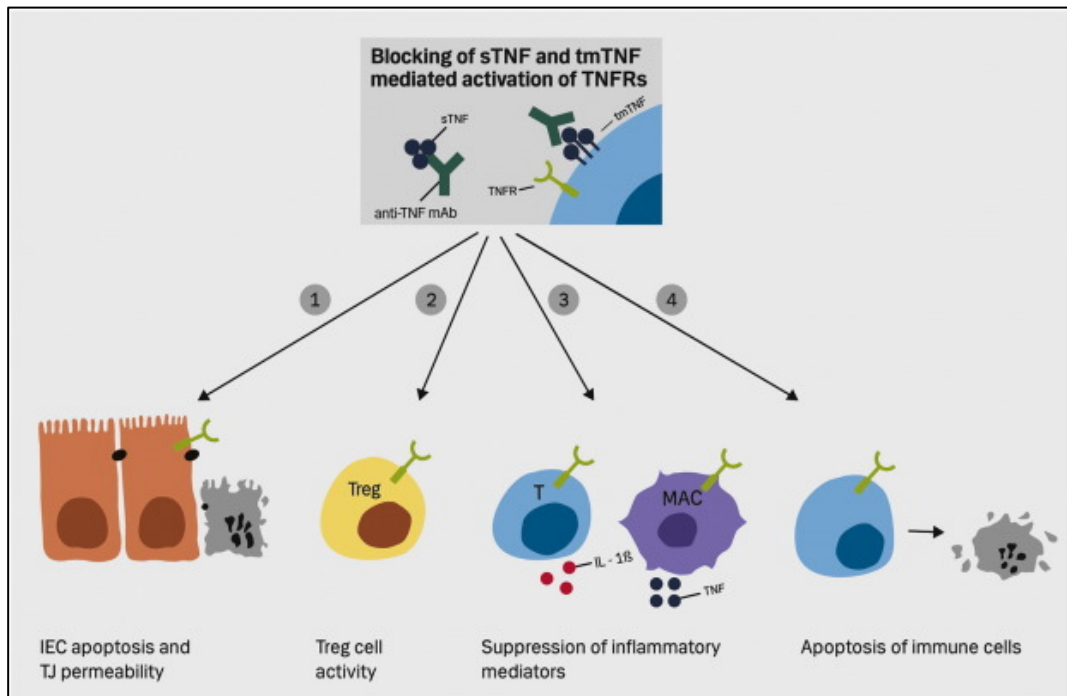


Abbildung 8: Mögliche Mechanismen/Konsequenzen der Tnf- α -Blocker vermittelten Bindung der sTNF und tmTNF und der resultierenden Inhibierung der TNF Rezeptor Aktivierung. (Olesen et al., 2016)

1) Verringerte intestinale Permeabilität durch reduzierte intestinale Epithelzell (IEC) Apoptose und reduzierte Tight junction (TJ) Permeabilität. 2) Gesteigerte regulatorische T-Zell Aktivierung. 3) Reduzierte Expression von inflammatorischen Mediatoren aus immunaktiven Zellen (z.B. T-Zellen (T) und Makrophagen (MAC)). 4) Induktion von Apoptose in Immunzellen. (Olesen et al., 2016).

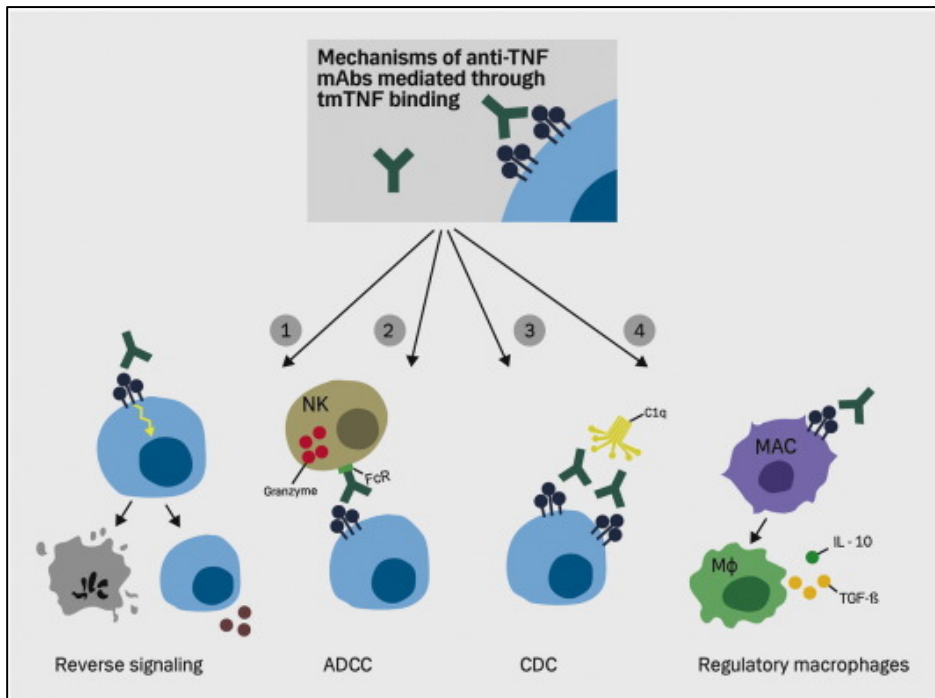


Abbildung 9: Mögliche Mechanismen der tmTNF- abhängigen TNF- α -Blocker Funktion (Olesen et al., 2016).

1) Einleitung von Apoptose und verminderter Expression inflammatorischer Mediatoren in tmTNF-exprimierenden Zellen durch „reverse signaling“. 2) Zelllyse durch ADCC (Antikörper- abhängige zelluläre Zytotoxizität). 3) Zelllyse durch CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität). 4) Differenzierung von regulatorischen Makrophagen. (Olesen et al., 2016)

1.7 Next Generation Sequencing

Traditionell wurden zur Untersuchung der Zusammensetzung der fäkalen Flora Kulturmethode eingesetzt. Jedoch können über 50% der Bakterien, die bei einer mikroskopischen Untersuchung beobachtet werden, nicht in einer Kultur angezüchtet werden (Guarner und Malagelada, 2003). Im Gegensatz zu den konventionellen Nachweismethoden sind die modernen Methoden kulturunabhängig und basieren auf der Amplifikation von Nukleinsäuren mittels Polymerasekettenreaktion und nachfolgender Sequenzierung des Amplifikats. Die Sequenzierung von Nukleinsäuren ist eine Methode zur Ermittlung der exakten Abfolge von Nukleotiden in einem DNA oder RNA Molekül. Die 16S rRNA ist die molekulare Hauptkomponente der kleineren Untereinheit prokaryotischer Ribosomen (Brosius et al., 1978). Die Sanger- Sequenzierung, welche auch Kettenabbruchmethode genannt wird, wurde 1975 von Edward Sanger entwickelt und galt als Goldstandard-Methode

für die Sequenzierung von Nukleinsäuren. Mit der Entwicklung von moderneren Sequenzierungstechniken, Next-Generation-Sequencing, gibt es kostengünstigere und schnellere Methoden die einen höheren Durchlauf an Sequenzierungen erreichen (Nguyen und Burnett 2014). Es gibt verschiedene Plattformen für das Next Generation Sequencing mit zum Teil unterschiedlichen Sequenzierungstechniken. Da das 16S rRNA Gen in allen Bakterien präsent ist, erlaubt die Sequenzierung des 16S rDNA Bereiches eine Identifizierung von vielen Bakterien. Das Gen für die Kodierung der 16S rRNA befindet sich auf der ribosomalen DNA (16S rDNA) und besteht aus 1550 Basenpaaren (Clarridge 2004). Große Mengen an Sequenzen des 16S rRNA Gens (>79000) sind in Datenbanken verfügbar und können zur Gewinnung phylogenetischer Informationen der Bakterien genutzt werden (Zoetendal et al., 2004). Durch die Genauigkeit der Sequenzanalyse beim Next Generation Sequencing ist auch eine nachfolgende Zuordnung zu Bakteriengattungen besonders erfolgreich. Die Bakterien werden zur Einteilung in ein hierarchisches System nach ihren morphologischen, physiologischen, biochemischen, färberischen, antigenen und genetischen Merkmalen eingeordnet (Domäne → Abteilung → Klasse → Ordnung → Familie → Gattung → Art).

Die in dieser Arbeit verwendete Sequenzierungsmethode ist die sequencing-by-synthesis (SBS)-Methode, die von Illumina 2006 eingeführt wurde. Bei dieser Methode wird die fragmentierte Template-DNA über spezifische Adaptoren kovalent an einen Glasobjektträger (FlowCell) gebunden, auf der die Sequenzierreaktion stattfindet. Dazu wird ein Fragment des 16S rRNA-Gens aller Bakterien mit universellen Primern amplifiziert. Diese Primer enthalten außerdem sample-spezifische Sequenz-Barcodes, die es erlauben, PCR-Produkte verschiedener Proben in einem Sequenzierungsansatz zu kombinieren und erst im Anschluss bioinformatisch wieder einzelnen Proben zuzuordnen. Von dem gebundenen Startmolekül ausgehend werden durch einen PCR-ähnlichen Schritt Cluster aus identischen Molekülen gebildet (Bridge-amplification). Die Sequenzierung erfolgt zyklusweise und nutzt reversible Terminatorchemie und fluoreszenzmarkierte Nukleotide. In jedem Sequenzierzyklus wird genau ein Nukleotid komplementär zu der Template-DNA eingebaut. Anschließend wird die Fluoreszenzgruppe abgespalten, das folgende Lichtsignal detektiert und die Terminatorgruppe entfernt, so dass ein weiteres Nukleotid im folgenden Zyklus eingebaut werden kann (Quail et al., 2012) (**Abb.10**). Resultierende Sequenzen werden bioinformatisch aufgearbeitet (Entfernung nicht verwertbarer Sequenzen, PCR-Chimären, Zuteilung zu Ursprungsproben) und sowohl taxonomisch (Spezies-Klassifizierung) als auch statistisch (basierend auf

Sequenz-Ähnlichkeiten, d.h. über “operational taxonomic units, OTUs”) untersucht. Verschiedene Proben werden anhand von unterschiedlichen Mikrobiota-Parametern verglichen (Diversität, qualitative und quantitative Spezies-Zusammensetzung, relative Anteile einzelner Bakteriengruppen etc.).

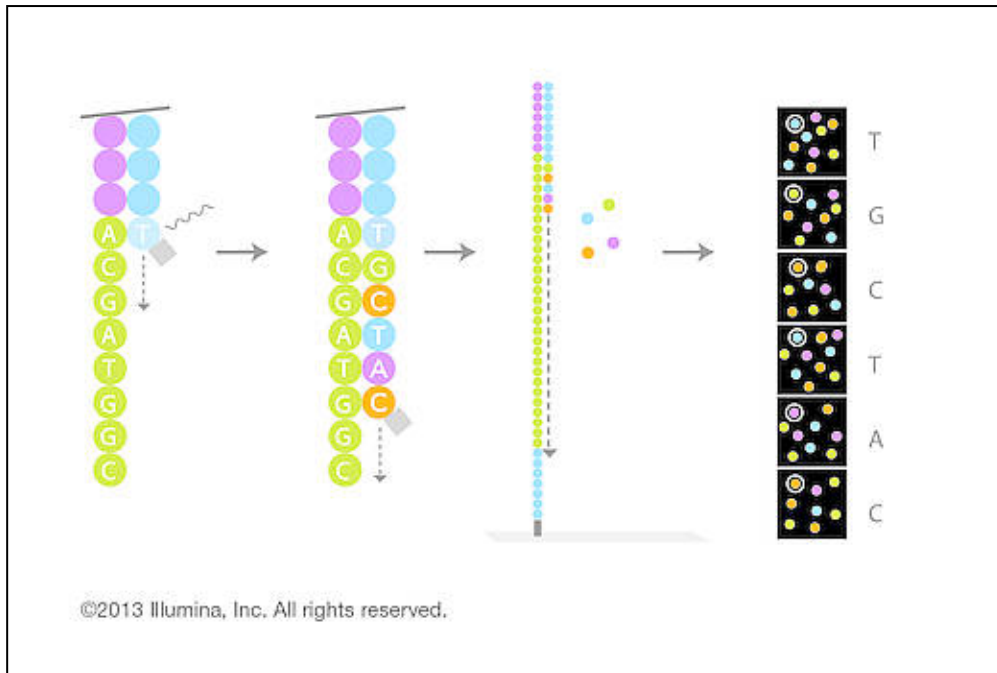


Abbildung 10: Ablauf des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (www.illumina.com).

Ein besonderes Merkmal der Illumina SBS-Methode ist die Möglichkeit, eine sogenannte Paired-End-Sequenzierung durchzuführen. Hierbei werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente von jeder Seite mit einer vorher festgelegten Leseweite von 100-250 bp sequenziert. Je nach Größe der DNA-Fragmente können diese Reads überlappen oder durch einen nicht-sequenzierten DNA-Teil (Insert) getrennt sein. Die Paired-End-Sequenzierung bietet viele Vorteile bei der bioinformatischen Auswertung und kann die Genauigkeit der Analysen signifikant erhöhen (**Abb.11**).

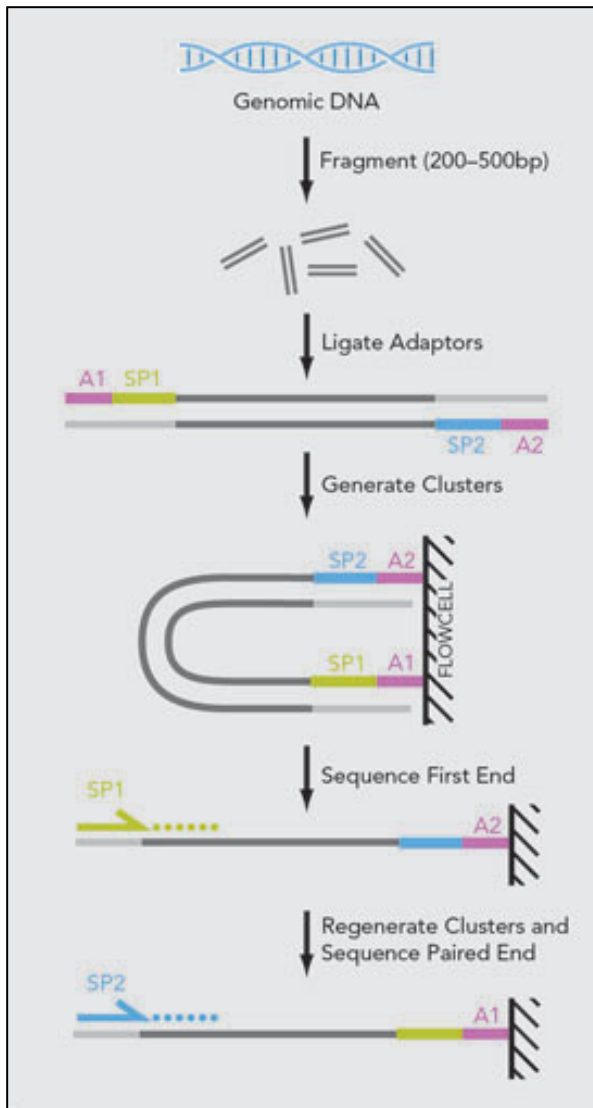


Abbildung 11: Ablauf der Paired-End Sequenzierung (www.illumina.com).

2. Fragestellung

In vielen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer intestinalen Dysbiose und einer CED beobachtet werden. Allerdings ist unklar, ob diese Veränderung der Bakterienzusammensetzung Grund für die Entstehung von CED oder deren Konsequenz ist. Um das Verständnis der Interaktion zwischen Darmflora und Entstehung einer CED weiter zu verbessern, wurde in der vorliegenden Arbeit die Mukosa-assoziierte Darmflora aus Biopsien aus Routinekoloskopien von klinisch gut charakterisierten CED-Patienten untersucht.

Ziel war es die verschiedenen vorliegenden Bakteriengattungen sowie Unterschiede in der Anzahl der Bakterien zu bestimmen und diese Erkenntnisse mit den klinischen Parametern zu korrelieren. Für jeden einzelnen Patienten wurde zunächst die Bakterienzusammensetzung der Mukosabiopsien durch eine hochauflösende 16S rRNA Gen Amplikon Sequenzierung bestimmt. Eine Einteilung in die Kategorie der Krankheitsaktivität der CED zum Zeitpunkt der Koloskopie mit Probenentnahme wurde vorgenommen. Bisher konnte noch keine Assoziation zwischen höherer Krankheitsaktivität und veränderter bakterieller Zusammensetzung bei CED Patienten nachgewiesen werden, auch dieser Fragestellung widmete sich diese Arbeit. Die MC Patienten wurden anhand des CDAI in drei Kategorien der Krankheitsaktivität („Remission“, „moderat“ und „hohe Aktivität“) und die CU Patienten anhand des Mayo-Scores in zwei Kategorien („Remission“ und „hohe Aktivität“) unterteilt. Es wurde schließlich ermittelt, ob sich innerhalb der Kategorien der Krankheitsaktivität ein einheitliches Bild der Bakterienzusammensetzung ergibt. Hierzu wurden statistische Verfahren genutzt, um Ähnlichkeiten und Unterschiede der bakteriellen Zusammensetzung aufzuzeigen. Der Einfluss weiterer klinische Parameter, die im Zusammenhang mit einer möglichen Dysbiose stehen könnten, wie der lokale Schleimhautentzündungsstatus, wurden betrachtet. Es wurde untersucht, ob an Stellen mit „gesunder“ Mukosa eine andere Bakterienzusammensetzung als an Stellen mit entzündlich veränderter Mukosa besteht. Auch das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation wurde erfasst, da diese in verschiedenen Studien mit einer veränderten Bakterienzusammensetzung in Verbindung gebracht wurde. Der Einfluss einer Therapie mit TNF- α -Blockern auf die Bakterienzusammensetzung und eine mögliche Verschiebung in Richtung einer „gesunden“ Bakterienzusammensetzung wurden ermittelt. Insgesamt soll diese Arbeit einen weiteren Beitrag zu einem besseren wissenschaftlichen Verständnis erbringen, welchen Einfluss die intestinale bakterielle Komposition auf den klinischen Verlauf bei CED Patienten hat.

Thesen:

- Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehen mit einer Dysbiose einher.
- Das Ausmaß der Krankheitsaktivität (gemessen in CDAI bzw. Mayo Score) spiegelt sich in der Bakterienzusammensetzung wieder.
- Die TNF- α -Blocker, die eine wichtige Rolle in der Therapie des MC spielen, führen zu einer Wiederherstellung der mukosalen Bakterienzusammensetzung.
- Die Bakterienzusammensetzung im Darm ist abhängig von der Tatsache, ob die Proben aus makroskopisch entzündlich veränderten oder makroskopisch gesunden Darmabschnitten entnommen wurden.
- Das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation führt zu einer veränderten Bakterienzusammensetzung im Darm.
- Es existieren bestimmte Bakterienstämme, welche bei einer höheren Krankheitsaktivität verstärkt auftreten.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die Analyse umfasste 54 Schleimhautbiopsien von MC Patienten und 13 Schleimhautbiopsien von CU Patienten, die bei Koloskopien aus klinischer Indikation durchgeführt wurden.

Die Schleimhautbiopsien wurden aus makroskopisch gesundem und wenn vorhanden zusätzlich aus makroskopisch entzündetem Schleimhautareal des Kolons entnommen.

3.1.1 DNA Isolation:

(Protocol: Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection. QIAamp DNA Stool Handbook 06/2012)

(Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol). QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 06/2012)

Verbrauchsmaterialien:

InhibitEX Tabletten	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Proteinase K	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Puffer AL	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Ethanol (96-100%)	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
QIAamp- Spinsäule	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Puffer AW1	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Puffer AW2	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Puffer AE	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg (D)
20 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
20 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
200 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
200 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
1000 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
1000 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)

Geräte:

Biopsiegewebe Zerümmerer	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Vortex 2X ³	Uniequip, Planegg (D)
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg (D)

Inkubator DRI-Block DB3	TECHNE, Staffordshire (UK)
-------------------------	----------------------------

3.1.2 NOD2-Genotypisierung:

Genotyping Assay C__11717468_20	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Genotyping Assay C__11717466_2	Applied Biosystems, Foster City (USA)
SNP8 R702W	Life Technologies GmbH, Carlsbad (USA)
SNP12 G908R	Life Technologies GmbH, Carlsbad (USA)
SNP13 1007fs	Life Technologies GmbH, Carlsbad (USA)

3.1.3 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation für das Illumina MiSeq System:

Amplicon PCR Forward Primer (16_Amplicon FW, Sequenz 5'=>3'): TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG

Amplicon PCR Reverse Primer (16_Amplicon_RE, Sequenz 5'=>3'): GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C

Verbrauchsmaterialien:

Amplicon PCR Reverse Primer	BioTez Berlin Buch GmbH, Berlin (D)
Amplicon PCR Forward Primer	BioTez Berlin Buch GmbH, Berlin (D)
KAPA Hifi Hotstart ReadyMix	KAPA Biosystems, Wilmington (USA)
10 mM Tris pH 8,5	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Ampure XP beads	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
80% Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
dNextera XT Index 1 Primers (N7XX) von dem Nextera XT Index kit	Illumina, San Diego (USA)
Nextera XT Index 2 Primers (S5XX) von dem Nextera XT Index kit	Illumina, San Diego (USA)
DNA-freies PCR Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hybridization Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
0,2 N NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
PhiX Control Kit v3	Illumina, San Diego (USA)
Microseal 'A' film	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Microseal 'B' film	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
96-well 0,2 ml PCR Platte	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg (D)
10 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
10 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
20 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
20 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
200 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)
200 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
1000 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg (D)

1000 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg (D)
------------------------	------------------------

Geräte:

MiSeq Sequenzierer	Illumina, San Diego (USA)
ABI Prism 7000 Real Time PCR	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg (D)
Vortex 2X ³	Uniequip, Planegg (D)
Truseq Index Plate Fixture	Illumina, San Diego (USA)
MiSeq reagent cartridge	Illumina, San Diego (USA)
Magnetstand-96	Illumina, San Diego (USA)
Bioanalyzer Agilent DNA 1000 chip	Illumina, San Diego (USA)
Qbit kit	Illumina, San Diego (USA)

3.1.4 Software:

Qiime	http://qiime.org
SILVA release version 115	https://www.arb-silva.de/documentation/release-115/
cd-hit-est version 3.1.2	http://weizhongli-lab.org/cd-hit/
BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/news/04-05-2013-blast-2-2-28/
Explicet	http://www.explicet.org/Explicet

PAST software package version 3.08	http://folk.uio.no/ohammer/past/
LefSe	http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy

3.2 Methoden:

33 Patienten mit CED der Universitätsklinik Rostock (Deutschland) haben an der Studie teilgenommen. Von den 33 CED Patienten hatten 26 Patienten MC und 7 Patienten CU. Aus klinischer Indikation wurde bei den Patienten eine Koloskopie durchgeführt. Ein entsprechendes Ethik-Votum liegt vor (Reg.-Nr. A 2012-0121). Die Untersucher haben bei der Koloskopie den Entzündungsstatus der Schleimhaut bewertet und Schleimhautbiopsien aus makroskopisch gesundem und wenn vorhanden aus makroskopisch entzündetem Schleimhautareal des Kolons entnommen. Insgesamt lagen 67 Schleimhautbiopsien für die Untersuchung vor, 54 Biopsien von MC Patienten und 13 Biopsien von CU Patienten.

Zusätzlich wurde von den MC Patienten eine EDTA Blutprobe für die Analyse von Mutationen im *NOD2*-Gen entnommen.

Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Universität Rostock genehmigt (A 2012-0121). Ein Aufklärungsbogen wurde den Patienten vor Einwilligung zur Durchsicht ausgehändigt. Die Patienten haben vor Beginn der Studie eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben.

3.2.1 DNA Isolierung:

Zur Isolierung der DNA aus den vorliegenden Schleimhautbiopsien wurde das DNA Stool Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und das vom Hersteller empfohlenen Protokoll „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ (QIAamp DNA Stool Handbook 06/2012) genutzt.

Erläuterung:

Durch Erhitzen der Probe wurden Bakterienzellwände und Parasiten zerstört und die DNA in Lösung gebracht. Die ungelösten Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und verworfen. PCR Inhibitoren und DNA zerstörende Substanzen konnten durch Zugabe von InhibitEx Tabletten an die InhibitEx Matrix adsorbiert und durch Zentrifugation isoliert und entfernt werden. Proteinase K katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen und wurde zum Abbau von Proteinen im Zelllysat genutzt. Die isolierte DNA wurde an der Silicagelmembran der QIAamp- Aufreinigungssäule gebunden und in mehreren Schritten durch Pufferzugabe gewaschen. Zum Schluss konnte die aufgereinigte DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers wieder in Lösung gebracht werden und bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren werden.

Durchführung:

Da es sich um Schleimhautbiopsien handelte und keine, wie im Ursprungsprotokoll vorausgesetzten Stuhlproben, mussten die ersten Vorbereitungsschritte zur DNA Isolierung leicht abgewandelt werden. Die Schleimhautbiopsien wurden nach Entnahme bei der Koloskopie getrennt in ATL Puffer gesammelt und sofort bei -80°C eingefroren.

Zur Vorbereitung der DNA Isolation wurden die Biopsien schonend bei -4°C aufgetaut und anschließend mit dem Gewebetrenner homogenisiert.

Die weiteren Schritte sind entsprechend des Protokolls „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ durchgeführt worden.

Die 1,6 ml homogenisierte Schleimhautprobe wurde 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Danach folgte Durchmischung für 15 Sekunden und Zentrifugation für 1 Minute. Die überstehende Flüssigkeit konnte in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß übertragen und der feste Rückstand verworfen werden. Um die Suspension von störenden PCR-Inhibitoren zu reinigen, wurde die InhibitEX Tablette hinzugegeben und die Probe anschließend 1 Minute gevortext und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die an die InhibitEx Matrix gebundenen Substanzen konnten anschließend durch 3 minütige Zentrifugation abgetrennt und verworfen werden. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß übertragen und erneut für 3 Minuten zentrifugiert. Zum Abbau von störenden Proteinen wurden 15 µl Proteinase K zunächst in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und anschließend die 200 µl des gelösten Überstandes zu der Proteinase K übertragen. Nun wurden 200 µl Puffer AL zur Suspension pipettiert und

für 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 70°C inkubiert um weitere Proteine abzubauen. Zur DNA Fällung wurde 200 µl 96-100% Ethanol zur Probe gegeben.

Das Lysat wurde vorsichtig in eine QIAamp- spin column, eine Aufreinigungssäule mit Silicagelmembran, übertragen und für 1 Minute zentrifugiert. Die DNA bindet an die Membran, während sonstige Bestandteile ausgewaschen werden. Das Filtrat wurde verworfen, und die Aufreinigungssäule wurde zusammen mit der an die Membran gebundene DNA in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt. In die Säule wurde 500 µl Waschpuffer AW1 hinzugegeben und 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, und die QIAamp- Spin column wurde in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffer AW2 in die QIAamp- Spin column wurde erneut 3 Minuten zentrifugiert und das Filtrat erneut verworfen. Der in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzte QIAamp- Spin column wurde 100 µl Elutionspuffer AE hinzugegeben, um die gereinigte DNA aus der Membran zu waschen. Nach einer Inkubation von 1 Minute bei Raumtemperatur und einer weiteren 1 minütigen Zentrifugation ließ sich die DNA herauslösen. Die DNA wurde bis zu nächsten Verwendung eingefroren.

Bestimmung der DNA- Konzentration:

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und anschließen auf 5ng/µl verdünnt.

3.2.2 Vorbereitung der 16S rRNS Gens für für die Sequenzierung mit dem Illumina MiSeq System

Zur Sequenzierung wurden Primer, die an die variable V3 und V4 Region der 16S rRNA Gene zur Sequenzierung binden, wie von Klindworth beschrieben, genutzt (Klindworth et al., 2013). Die Illumina Überhang Adaptersequenzen wurden wie im Illumina „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ Protokoll (www.illumina.com) aufgeführt, zu den Locus spezifischen V3/V4 16S Amplicon PCR forward und reverse Primern hinzugefügt (**Abb.12**).

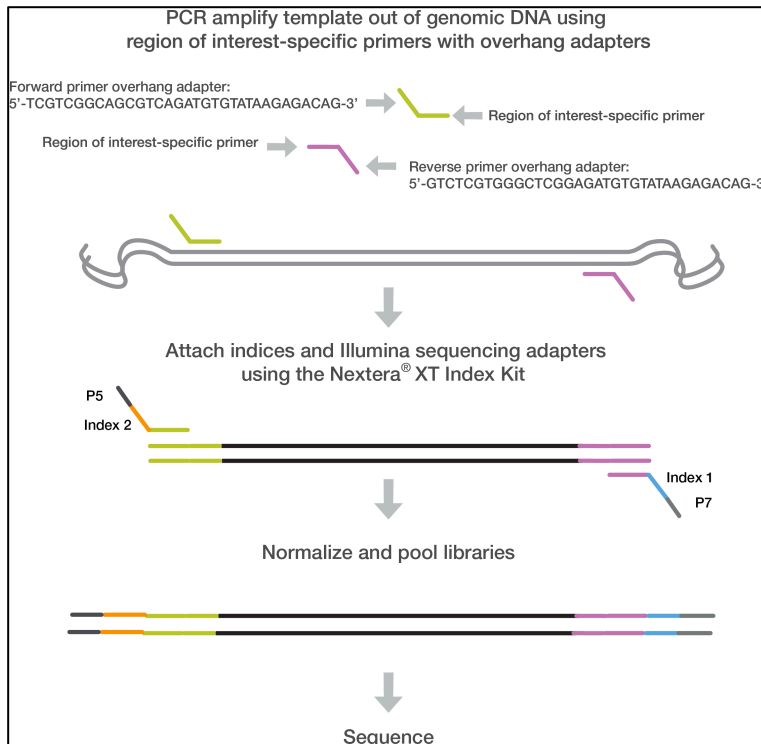


Abbildung 12: 16S V3 und V4 Amplicon Arbeitsablauf. Zur Amplifizierung der Matrizen aus der genomischen DNA werden benutzerdefinierte forward und reverse Primer mit überhängenden Adapttern genutzt, die komplementär zu der zu untersuchenden Region sind. Ein nachfolgender Amplifizierungsschritt wird genutzt, um multiplexing Indices und Illumina Sequenzierungs Adapter hinzuzufügen. Die Bibliothek wird normalisiert und gepoolt und anschließend auf dem MiSeq System mit dem v3 Kit sequenziert. (www.illumina.com)

DNA-Isolierung und Aufreinigung, sowie die von dem Illumina Protokoll geforderte DNA Normalisierung auf eine DNA Konzentration von 5 ng/μl wurden wie oben erläutert im Vorfeld durchgeführt. Die Amplikon PCR, PCR Aufreinigung, Index PCR, PCR Aufreinigung 2, Library Quantifizierung, Normalisierung und Poolbildung wurden nach dem oben genannten Handbuch durchgeführt.

Erläuterung:

Nach Extraktion und Aufreinigung der DNA aus den Biopsien und Normalisierung der DNA Konzentration auf 5 ng/μl, wurden in der Amplikon PCR mit Hilfe von Primern und Überhang Adapttern die V3 und V4 Region des 16S rNS Gens amplifiziert. Danach folgte ein Aufreinigungsprozess um die 16S V3 und V4 Amplifikate von den Primern zu trennen. In der Index PCR wurden Duale Indexe und Illumina Sequenzierungsadapter mit Hilfe des Nextera XT Index Kit an die Amplifikate gebunden. Ein weiterer Aufreinigungsschritt folgte, um die

Probe für die Quantifizierung vorzubereiten. Bioanalyzer DNA 1000 Chips und Qbit Kits wurden zur Quantitäts - und Qualitätskontrolle jeder Probe genutzt.

Amplicon PCR:

Auf der 96-Well 0,2 ml PCR Platte wurde pro Well 2,5 µl der aufgereinigten DNA mit jeweils 5 µl von Amplicon PCR Forward Primer 1 (1 µM) und Amplicon PCR Reverse Primer 1 (1 µM) und 12,5 µl von 2xKAPA Hifi HotStart ReadyMix zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgesetzt. Da in dieser Studie insgesamt 67 Biopsieproben von MC/ CU – Patienten zur Verfügung standen, konnten 67 Wells der PCR Platte befüllt werden. Nach Versiegelung der PCR Platte mit einer Microseal A Folie konnte die PCR in dem ABI Prism 7000 Real Time PCR Instrument durchgeführt werden. Das Programm des Thermocyclers wurde eingestellt auf 95°C für 3 Minuten gefolgt von 25 Zyklen von 95°C, 55°C und 72°C für jeweils 30 Sekunden und anschließend 72°C für 5 Minuten. Die PCR Platte wurde auf 4°C abgekühlt. Nach der PCR wurde der Bioanalyzer DNA 1000 Chip genutzt, um die Größe der DNA Abschnitte für jede Probe zu kontrollieren. Es wurde jeweils 1 µl von jeder Probe für diese Kontrolle verwendet. Die zu erwartende Amplikon Größe von 550 bp konnte verifiziert werden.

PCR Aufreinigung:

Die Amplikon PCR Platte wurde mit 1000 x g bei 20°C für 1 Minute zentrifugiert. Die auf Raumtemperatur gebrachten AMPure XP Beads wurden für 30 Sekunden gevortext und anschließend wurde 20 µl der beads in jedes Well der Amplikon PCR Platte gegeben. Die Beads wurden durch zehnmaliges hoch und runter pipettieren mit dem Amplifikat vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Amplicon PCR Platte auf einen Magnetstand gestellt bis sich ein klarer Überstand gebildet hatte, welcher abpipettiert und verworfen wurde. Zur Reinigung der beads wurde zweimal hintereinander ein Reinigungsprozess durchgeführt, in dem 200 µl 80% Ethanol in jedes Well gegeben und die Platte anschließend für 30 Sekunden bei Raumtemperatur auf dem Magnetstand inkubiert wurde. Der klare Überstand wurde jeweils abpipettiert und verworfen. Auf dem Magnetstand wurde die PCR Platte 10 Minuten stehen gelassen, bis die Beads an der Luft getrocknet waren. Die Platte wurde von dem Magnetstand entfernt und 52,5 µl 10 mM Tris pH 8.5 Puffer wurde in jedes Loch pipettiert und durch zehnmaliges hoch und runter pipettieren mit den

beads vermischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Minuten. Weiterführend wurde die Platte auf den Magnetstand platziert bis sich ein klarer Überstand aus von freien Primern gereinigter DNA gebildet hat. 50 µl dieses Überstands wurden von jeder Probe aus der Amplikon PCR Platte auf eine neue 96-Loch PCR Platte übertragen.

Index PCR:

5 µl von den jeweils 50 µl der gereinigten DNA wurden auf eine neue 96-Well PCR Platte übertragen. Die jeweils übrigbleibenden 45 µl wurden für das Protokoll nicht weiter benötigt und wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. In jedes Well wurde jeweils 5 µl des Nextera XT Index Primer 1 und Nextera XT Index Primer 2 gegeben, um die dual indices und Illumina sequencing adapters hinzuzufügen. Es folgten jeweils 25 µl von 2x KAPA Hifi HotStart ReadyMix und 10 µl PCR Wasser. Jede Well hatte somit ein Volumen von 50 µl. Durch zehnmaliges resuspendieren wird jeder Reaktionansatz gut vermischt. Die PCR Platte wurde mit einem Microseal A bedeckt und für 1 Minute bei 20°C bei einer Geschwindigkeit von 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR unter folgenden Einstellungen durchgeführt: 95°C für 3 Minuten, gefolgt von 8 Zyklen von 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden, gefolgt von 72°C für 5 Minuten und dann auf 4°C heruntergekühlt.

PCR Aufreinigung 2:

Die Index PCR Platte wurde mit 280 g bei 20°C zentrifugiert. Die AMPure XP Beads wurden für 30 Sekunden gevortext. Jeweils 56 µl der AMPure XP beads wurde zu jeder Probe auf der PCR Platte gegeben. Die weiteren Schritte zur Reinigung der Beads wurden wie im ersten PCR Aufreinigungsprozess durchgeführt. Nach Trocknung der Beads und Entfernung der Index PCR Platte von dem Magnetstand wurden jeweils 27,5 µl von 10 mM Tris pH 8,5 Puffer in jedes Well der PCR Platte gegeben und durch zehnmaliges hoch und runter pipettieren mit den Beads vermischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Minuten. Anschließend wurde die Platte auf den Magnetstand platziert bis sich ein klarer Überstand aus gereinigter in Lösung gegangener DNA gebildet hat. 25 µl dieses Überstands wurden von jeder Probe aus der Index PCR Platte auf eine neue 96-Loch PCR Platte übertragen. Es wurden jeweils 1 µl einer 1:50 Verdünnung von jeder Probe verwendet, um mit Hilfe des

Bioanalyzer 1000 Chips die Größe der DNA Abschnitte zu kontrollieren. Die zu erwartende Amplikon Größe von 630 bp konnte verifiziert werden.

Library Quantifizierung, Normalisierung und Pooling:

Die DNA-Konzentration der Proben wurde fluorometrisch mit Qbit gemessen. Die Werte lagen zwischen 0,5 – 10,0 ng/ µl. Jede einzelne Library wurde mit 10 nM Tris pH 8,5 auf 4 nM verdünnt. Dann wurde von jeder 4 nM Library 5 µl zusammen pipettiert.

Library Denaturierung und MiSeq Sample Beladung

Zur Vorbereitung der Clustererstellung und Sequenzierung wurden die gepoolten Libraries durch 0,2N NaOH denaturiert, mit einem Hybridisierungspuffer verdünnt und anschließend hitzedenaturiert. 5 µl der gepoolten 4 nM Library wurden mit 5 µl 0,2N NaOH in einem Mikoreaktionsgefäß kombiniert. Nach kurzer Durchmischung mit dem Vortexer, wurde die Probe bei 280 x g bei 20°C für eine Minute zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA in Einzelstränge zu denaturieren. In das Mikoreaktionsgefäß mit der denaturierten DNA wurden nun 990 µl des Hybridisierungspuffers HT1 hinzugefügt, wodurch eine 20 pM denaturierte Library entstand. Um die empfohlene Stoffmenge von 4 pmol zu erhalten, wurde 120 µl aus der 20 pM denaturierten Library mit 480 µl HT1 kombiniert. Anschließend wurde die DNA Lösung Pulszentrifugiert. Eine 15 % PhiX Lösung wurde zur internen Kontrolle angesetzt. Hierfür wurde zunächst 2 µl 10 nM PhiX Library mit 3 µl 10 nM Tris pH 8,5 kombiniert, um eine 4 nM PhiX Library zu erhalten. Anschließend wurde 5 µl 4 nM PhiX Library mit 5 µl 0,2 N NaOH zu einer 2 nM PhiX Library kombiniert und gevortext. Zur Denaturierung der PhiX Library folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Durch Kombination von 10 µl der denaturierten PhiX Library mit 990 µl HT1 entstand eine 20 pM PhiX Library, welche genau wie die Amplikon Library auf 4 pM verdünnt wurde. Anschließend wurden 30 µl der denaturierten und verdünnten PhiX Library mit 570 µl der denaturierten und verdünnten Amplikon Library vermischt. Vor Beladung der MiSeq v3 Kassette wurde die Kombinierte PhiX und Amplikon Library für 2 Minuten bei 96°C auf einem Heizblock denaturiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung für 5 Minuten in einem Eisbad abgekühlt.

3.2.3 Datenanalyse:

Die Datenanalyse und statistische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Herlemann (Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde, Rostock). Hierfür wurde die „joined paired-end Illumina reads“ Funktion von qiime (Caporaso et al., 2011) mit „default“ Einstellung genutzt, um die forward und reverse Sequenzen mit einer Überlappung von mindestens 20 bp zu verbinden und fastq in fasta mit der „convert_fastaqual_fastq“-Funktion umzuwandeln. Sequenzen ohne Überlappung wurden verworfen. Die sich daraus ergebenden zusammengesetzten Sequenzen wurden mit Silva NGS pipeline bewertet (Pruesse et al., 2007) mit der SILVA release version 115 mit default Einstellung (ambiguity and homopolymers 2%, OTU clustering 97%, min seq. quality 30%, min length 150 bp, min align. Identity 50%) analysiert. Der SILVA NGS Datenanalyse nutzt SILVA Incremental Aligner um Kontaminationen des Datensatzes mit nicht-rRNA Sequenzen und Sequenzen mit ambiguity und homopolymers (max. 2%) zu entfernen. Nach der Qualitätskontrolle wurden identische Abschnitte zu OTUs getrennt (dereplicated) und der Referenzabschnitt für jede OTU wurde klassifiziert. Dereplication und Cluster- Bildung basieren auf dem cd-hit-est version 3.1.2 (Li und Godzik, 2006). Die Cluster- Bildung wurde mit dem Kriterium einer minimalen Sequenzidentität von 97% zueinander durchgeführt. Für jede OTU wurde der jeweils längste Abschnitt als Referenz des Clusters für die taxonomische Klassifizierung durch BLAST (Version 2.2.28+) und SILVA SSURef Datensatz (release 115) genutzt. Die daraus resultierende Klassifikation von jeder Referenzsequenz eines Clusters wurde allen Teilen des entsprechenden Clusters und seinen Replikaten zugeordnet. Sequenzen die eine durchschnittliches BLAST alignment coverage und alignment identity von weniger als 93% aufwiesen, wurden als nicht- klassifiziert betrachtet. Diese Analyse verwarf 3,864,086 Abschnitte (33%). Die verbliebenen 11,569,544 Sequenzen wurden für die weitere Analyse verwendet. Die Sequenzen wurden zu 677,152 OTUs angeordnet und durch SILVA NGS in 602 Bakteriengattungen klassifiziert. Archaea und Eukaryoten zugeordnete Sequenzen wurden weggelassen, da die Primer keine repräsentativen Ergebnisse für diese Gruppen ergaben.

3.2.4 Statistische Analyse

Zur Einschätzung der Vielfalt wurde Explicitet (Robertson et al., 2013) genutzt, welches durch bootstrapping eine rarefaction-basierte (19508 Abschnitte) Analyse durchführte. Es wurden die durchschnittlichen Bakteriengattungen die während dieses Prozesses beobachtet wurden genutzt, da singletons, die während der Qualitätskontrolle entfernt wurden, die Basis für Chao1 und andere Diversitätsschätzungen sind. Variationen der Bakterienzusammensetzung wurden durch Non-metric multidimensional scaling (NMDS) mit Bray-Curtis dissimilarity charakterisiert. Dafür wurde das PAST software package version 3.08 (Hammer, 2001) genutzt. Eine linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) analysis (Segata et al., 2011) wurde durchgeführt um Bakteriengruppen, die sich signifikant zwischen den Proben unterscheiden, zu bestimmen. Hier wurde die default Einstellung bis auf die „One against all“- Strategie für multi-class analysis genutzt. Lefse nutzt einen nicht- parametrischen Test, der Standardtests für statistische Signifikanz mit zusätzlichen Tests für biologische Konsistenz und effect relevance verbindet.

3.2.5 *NOD2*-Genotypisierung

Zur Untersuchung der *NOD2*-Gen Mutation wurde von jedem MC Patienten eine Etylendiamintetraacetat (EDTA) Blutprobe gewonnen. Die drei wichtigsten *NOD2*-Gen Mutationen (SNP 8; R702W, NCBI reference SNP ID: rs2066844 und SNP 12; G908R, NCBI reference SNP ID: rs2066845 und SNP 13; 1007 fs, NCBI reference SNP ID: rs2066847) wurden wie kürzlich beschrieben aus genomischer DNA aus Vollblut bestimmt (Schäffler et al., 2013). Vollblut wurde in EDTA-antikoagulierten Röhrchen gesammelt und die DNA wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit anhand des Hersteller Protokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert.

Die Taqman MBG biallelic discrimination assay wurde genutzt mit den beiden pre-made assays c_ _ 11717468_20 und c_ _11717466_20 für die R702W und die G908R Punktmutation in *NOD2* sowie ein custom hergestelltes assay für die 1007 frame shift Mutation (forward primer, GTCCAATAACTGCATCACCTACCT; reverse primer, CAGACTTCCAGGATGGTGTTCATTC und VIC-bezeichnete Probe, CAGGCCCTTGAAAG; FAM-bezeichnete Probe, CAGGCCCTTGAAAG. Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). 20 ng der isolierten genomischen DNA wurden mit 10 µl

von TaqManUniversal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) und 0.8 µl von 20 × SNP Genotyping Assay vermengt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die PCR wurde auf dem ABI Prism 7000 real-time PCR Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. PCR Einstellung bestand aus einer Inkubation bei 95°C für 10 min gefolgt von 40 Zyklen bei 92°C für 15s und 60°C für 60s. Das Protokoll wurde nach den Herstellerinstruktionen durchgeführt und die Ergebnisse wurden mit der Sequence Detection System (SDS) Software V. 1.2.3. (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) untersucht.

3.2.6 Einteilung der Patienten nach Schweregrad ihrer Erkrankung

Es nahmen 26 MC Patienten und 7 CU Patienten an dieser Studie teil. Um die Patienten anhand der Aktivität ihrer CED einzuteilen, wurden klinische Indizes genutzt.

Mit dem CDAI (Best et al., 1976) wurde die Krankheitsaktivität der MC Patienten bestimmt. Die Berechnung der CDAI Punktzahl für den jeweiligen Patienten erfolgte retrospektiv auf der Basis der Informationen aus seiner Patientenakte. Zur Gliederung der Patienten in drei Gruppen wurde eine Einteilung in „Remission“ (CDAI 0-150), „moderate Aktivität“ (CDAI 151-220) und „hohe Aktivität“ (CDAI 221-450) vorgenommen.

Die Punktzahl des CDAI wurde für jeden Patienten entsprechend folgender Einteilung (Tabelle 1) berechnet:

Tabelle 1: Crohn's Disease Activity Index, (nach Best et al., 1976)

Klinische Parameter	Multiplikationsfaktor
Summe weicher Stühle in den letzten 7 Tagen	X 2
Grad der Bauchschmerzen in den letzten 7 Tagen - keine = 0 - gering = 1 - mäßig = 2 - stark = 3	X 5

<p>Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens in den letzten 7 Tagen</p> <ul style="list-style-type: none"> - keine = 0 - gering = 1 - mäßig = 2 - stark = 3 - unerträglich = 4 	X 7
<p>Anzahl der Crohn- assoziierten Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gelenkbeschwerden - Erythema nodosum - Stomatitis aphtosa - Fieber über 37,5°C - Iritis, Uveitis - Pyoderma gangraenosum - Analfisteln, Analabszesse, Analfisteln 	X 20
<p>Behandlung des Durchfalls in den letzten 7 Tagen symptomatisch nötig gewesen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nein = 0 - Ja = 1 	X 30
<p>Resistenzen im Abdomen palpabel</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nein = 0 - Fraglich = 2 - Sicher = 5 	X 10
<p>Hämatokrit</p> <ul style="list-style-type: none"> - Frauen: 42-Hkt - Männer: 47-Hkt 	X 6
<p>Gewicht</p> <p>(1-Gewicht/Standardgewicht) X 100</p>	X 1

Die Krankheitsaktivität der CU Patienten wurde anhand des Mayo-Score (Schroeder et al., 1987) berechnet. Wie bei den MC Patienten wurden hier die klinischen Parameter aus den Patientenakten und Koloskopiebefunden genutzt. Es wurde eine Einteilung der Krankheitsaktivität in „Remission“ (0-5) und „hohe Aktivität“ (≥ 6) unternommen. Die Punktzahl wurde für jeden Patienten mit der folgenden Tabelle berechnet:

Tabelle 2: Mayo-Score, (nach Schroeder et al., 1987)

Klinischer Befund	Punktzahl
Stuhlfrequenz pro Tag	<ul style="list-style-type: none"> - normal = 0 - 1-2 Stühle = 1 - 3-4 Stühle = 2 - >5 Stühle = 3
Rektaler Blutabgang	<ul style="list-style-type: none"> - kein Blut = 0 - Blutstreifen bei weniger als 50% der Stühle = 1 - Deutliche Blutbeimengung meistens = 2 - Auch Blut ohne Stuhl = 3
Endoskopischer Befund	<ul style="list-style-type: none"> - normaler Befund oder inaktive Erkrankung = 0 - milde Colitis (Erythem, leicht spröde Schleimhaut) = 1 - moderate Colitis (deutliches Erythem, Erosionen, Gefäßmuster verschwunden) = 2 - schwere Colitis (Ulzerationen, spontane Blutungen) = 3
Globale Beurteilung des Arztes	<ul style="list-style-type: none"> - normal = 0 - milde Erkrankung = 1 - moderate Erkrankung = 2 - schwere Erkrankung = 3

4. Ergebnisse

4.1 Morbus Crohn Patienten:

Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität des MC wurde für jeden Patienten der CDAI berechnet und den zugehörigen Biopsien zugeordnet. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem CDAI bestimmt und in drei Gruppe aufgeteilt: „Remission“ (CDAI 0-150), „moderate Aktivität“ (CDAI 151-220) und „hohe Aktivität“ (CDAI 221-450). Die Biopsien wurden bei der Koloskopie nach dem Entzündungsstatus des Entnahmeortes im Darm stratifiziert. Makroskopisch konnte eingeteilt werden, ob die Biopsien aus entzündetem Areal oder nicht-entzündetem Areal entnommen wurden. Die Patienten wurden auf *NOD2*-Mutation stratifiziert und die Behandlung mit TNF- α -Blocker (Infliximab, IFX/Adalimumab, ADA) wurde berücksichtigt.

Tabelle 3: Morbus Crohn-Patienten

Anzahl der Patienten	26
Geschlecht	11 männlich : 15 weiblich
Altersdurchschnitt	40 Jahre (20-73)
IFX/ADA	3
CDAI 0-150 (Biopsie)	18
CDAI 151-220 (Biopsie)	18
CDAI 221-450 (Biopsie)	18
CDAI Mittelwert	185,6 (38-332)
Anzahl der Biopsien	54
Anzahl der Biopsien mit makroskopisch entzündeter Mukosa	17
Anzahl der Biopsien mit makroskopisch gesunder Mukosa	37

Anzahl der Patienten mit <i>NOD2</i> -Mutation	4
--	---

Von den 26 Morbus Crohn Patienten haben 24 Patienten einer Bestimmung des Genotyps einer möglichen *NOD2*-Mutation zugestimmt. Die Genotypisierung wurde auf die drei häufigsten *NOD2*-Mutationen begrenzt (SNP 8, SNP 12, SNP 13). In 4 der 26 Patienten (16,7%) konnte mindestens eine Mutation des *NOD2*-Gens identifiziert werden. 2 Patienten haben der Genotypisierung nicht zugestimmt. Der Abschnitt des Darms aus dem die Biopsie entnommen wurde, ist für jeden MC Patienten in Tabelle 4 aufgelistet.

Detaillierte MC Patientien- Übersicht:

Tabelle 4: Detaillierte Übersicht der MC-Patienten mit Patientennummer, Alter, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose (ED), TNF- α Inhibitor (TNF-I), *NOD2*-Mutation (*NOD2*-M), Biopsie aus dem nicht entzündlichem Areal (B (n.e.)), Biopsie aus dem entzündlichem Areal (B (e)) mit Biopsieprobennummer

Patient	Alter, Geschlecht	ED	TNF-I	<i>NOD2</i> -M	B (n. e.)	B (e)	CDAI
1	44, m	1998	ADA		C. ascendens (20) C. sigmoideum (19)		172
2	26, w	2010			C. descendens (45)	C. sigmoideum (46) Rectum (47)	254
3	45, w	2014			Coecum (40)	C. sigmoideum (39)	232
4	22, m	2007			Coecum (50)	C. sigmoideum (51)	284
5	63, m	2003			C. transversum (3) C. descendens (4) C. sigmoideum (5)		80
6	29, m	2009		SNP12		C. ascendens (10) C. sigmoideum (11)	112
7	30, w	2010	IFX	SNP8	C. sigmoideum (12)		117
8	49, w	2000		SNP8	C. sigmoideum (9)	C. ascendens (8)	100
9	65, m	2013			C. transversum (48) C. sigmoideum (49)		274
10	31, w	2001	IFX		C. sigmoideum (44)	C. descendens (43)	251

11	59, w	1999	ADA		C. sigmoideum (7)	C. descendens (6)	83
12	25, w	2005			C. transversum (30)	C. sigmoideum (31)	198
13	44, w	1997		SNP13	C. ascendens (37) C. sigmoideum (38)		232
14	20, w	2011	IFX		C. transversum (28) C. sigmoideum (29)		192
15	62, m	2006			C. ascendens (13) C. sigmoideum (14)		126
16	44, w	2001			Coecum (16) C. transversum (17) C. sigmoideum (18)		133
17	28, w	2008			Coecum (24) C. sigmoideum (25)		189
18	21, m	2000			C. sigmoideum (52)		284
19	73, w	1975			C. sigmoideum (15)		132
20	51, w	2009			C. transversum (1) C. sigmoideum (2)		38
21	32, w	2001			C. ascendens (21) C. transversum (22) C. sigmoideum (23)		175
22	34, w	2005			C. ascendens (33) C. sigmoideum (34)	Coecum (32)	203
23	29, m	2011				C. ascendens (35) C. sigmoideum (36)	211
24	66, m	1993			C. ascendens (26)	C. sigmoideum (27)	190
25	20, m	2008			Coecum (41)	C. sigmoideum (42)	233
26	40, w	2006				C. ascendens (53) C. sigmoideum (54)	332

4.2 Colitis ulcerosa Patienten:

Die Krankheitsaktivität wurde mit dem Mayo-Score bestimmt. Anhand des Mayo-Scores wurde die Patientenkohorte in 2 Kategorien eingeteilt: „Remission“ (0-5) und „hohe Aktivität“ (≥ 6). Die CU Patienten wurden nicht auf das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation untersucht, da es keine wesentliche Korrelation zwischen der Mutation und der Erkrankung gibt (Silverberg et al., 2009).

Die klinischen Charakteristiken der CU Patienten sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgetragen.

Tabelle 5: Colitis ulcerosa Patienten

Anzahl der Patienten	7
Geschlecht	4 männlich : 3 weiblich
Altersdurchschnitt	53 Jahre (41-74)
IFX/ADA	2
Mayo 0-5	4
Mayo ≥ 6	3
Mayo Mittelwert	4,2 (0-8)
Anzahl der Biopsien	13
Anzahl der Biopsien mit makroskopisch entzündeter Mukosa	4
Anzahl der Biopsien mit makroskopisch gesunder Mukosa	9

Der Abschnitt des Darms aus dem die Biopsie entnommen wurde, ist für jeden Colitis ulcerosa Patienten in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Detaillierte Übersicht der CU Patienten mit Patientennummer, Alter, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, TNF- α Inhibitor (TNF-I), Biopsie aus dem nicht entzündlichem Areal (B (n.e.)), Biopsie aus dem entzündlichem Areal (B (e))

Patient	Alter, Geschlecht	Erstdiagnose	TNF-I	B (n.e.)	B (e)	Mayo-Score
27	45, w	1993	IFX	C.ascendens		1
28	56, w	2005		C.ascendens C.sigmoideum		0
29	41, m	2000		C.ascendens C.sigmoideum		4
30	48, m	2001		C.ascendens C.sigmoideum		7
31	74, m	2000		C.ascendens C.sigmoideum		2
32	62, m	2009			C.ascendens C.sigmoideum	8
33	47, m	2013	ADA		C.ascendens C.transversum	8

4.3 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Bakteriendiversität

Es wurden 54 Schleimhautbiopsien von 26 MC Patienten und 13 Schleimhautbiopsien von 7 CU Patienten analysiert. Auf dem MiSeq Illumina System wurden 1260 K/mm² (raw density) Cluster sequenziert. Dies ergab 17,5 Millionen Abschnitte. Mehr als 80% der Sequenzierungs- und Indexabschnitte hatten einen Q-Wert ≥ 30 . Der Qualitätswert (Q-Wert) berechnet die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Sequenzierung eine Base inkorrekt bestimmt wird. Ein hoher Q-Wert bedeutet eine geringe Wahrscheinlichkeit eines Fehlers, während ein niedriger Q-Wert eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Basenbestimmung angibt. Bei einem Q-Wert von 30 liegt die Wahrscheinlichkeit einer inkorrekten Basenbestimmung bei 1 zu 1000 und demzufolge eine korrekte Basenbestimmung von 99,9%. 3.864.086 Abschnitte (33%) wurden aussortiert. 11.569.544 Sequenzen wurden für die Analyse verwendet. Die Sequenzen wurden in 677,152 OTUs gruppiert und mit SILVA NGS in 602 Bakteriengattungen klassifiziert. Für MC konnten 559 Bakteriengattungen und für CU 401 Bakteriengattungen identifiziert werden.

Morbus Crohn

Die Krankheitsaktivität der 26 MC Patienten wurde mit dem CDAI berechnet. Anhand des CDAI Wertes wurden die 54 Biopsien der 26 MC Patienten in 3 Kategorien eingeteilt: 1: „Remission“ (CDAI 0-150) (n=18), 2: „moderaten Krankheitsaktivität“ (CDAI 151 – 220) (n=18), 3: „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221 – 450) (n=18) (**Abb.13**).

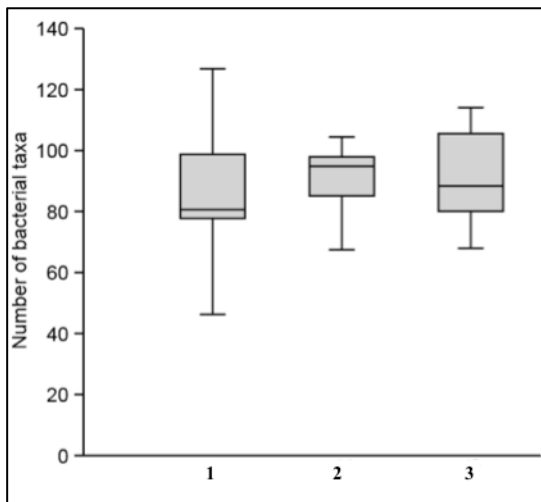


Abbildung 13: Anzahl der Bakteriengattungen in Biopsien von MC Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität. Auf der x-Achse ist die Krankheitsaktivität, gemessen mit dem CDAI, in 3 Schweregrade eingeteilt. 1: „Remission“ (CDAI 0-150) (n=18), 2: „moderaten Krankheitsaktivität“ (CDAI 150 – 220) (n=18), 3: „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 220 – 450) (n=18). Auf der y-Achse ist die Anzahl der Bakteriengattungen aufgetragen.

Beim Vergleich der Patienten in „Remission“, mit „moderater“ und mit „hoher Krankheitsaktivität“ fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der nachgewiesenen verschiedenen Bakteriengattungen. (Kruskal-Wallis Test $p > 0,05$). Der Kruskal-Wallis Test wird verwendet, wenn die Voraussetzung für eine Varianzanalyse nicht erfüllt sind (nicht-parametrisches Verfahren) und testet, ob sich die zentralen Tendenzen mehrerer unabhängiger Stichproben unterscheiden.

Colitis ulcerosa

Die Krankheitsaktivität der 7 CU Patienten wurde mit dem Mayo Score berechnet und die Patienten konnten in zwei Kategorien aufgeteilt werden: 1: „Remission“ Mayo Score 0 – 5 (n=6), 2: „hohe Aktivität“ Mayo Score ≥ 6 (n=7) (**Abb.14**).

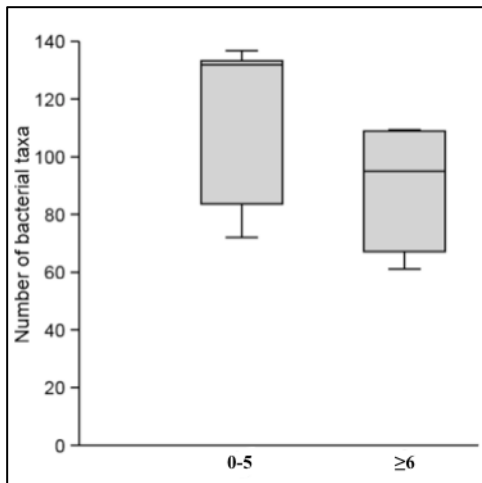


Abbildung 14: Anzahl der Bakteriengattungen in Biopsien von CU Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität. Auf der x-Achse ist die Krankheitsaktivität, gemessen mit dem Mayo-Score, in 2 Schweregrade eingeteilt. „Remission“: Mayo Score 0 – 5 (n=6), „hohe Aktivität“: Mayo Score ≥ 6 (n=7). Auf der y-Achse ist die Anzahl der Bakteriengattungen aufgetragen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Bakteriengattungen zwischen den Patienten in „Remission“ und denen mit „hoher Krankheitsaktivität“ (Kruskal-Wallis Test $p > 0,05$).

4.4 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die Bakterienzusammensetzung

Da die CED, wie in vorangegangenen Studien beschrieben, mit einer intestinalen Dysbiose assoziiert sind, erfolgte die Analyse der Mukosa-assoziierten Bakteriengemeinschaft aus mukosalen Biopsien (**Abb. 15 und 18**). Da in dieser Studie nur Biopsien von an CED erkrankten Patienten untersucht wurden, lag der Fokus der Analyse auf der Untersuchung von Unterschieden der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft zwischen den Kategorien der Krankheitsaktivität gemessen mit dem CDAI für MC und Mayo-Score für CU.

Die Analyse der Mukosa-assoziierten Bakteriengemeinschaften zeigte typische Bakteriengemeinschaften, die auch in Stuhlproben vorkommen. Die dominanten Bakterienstämme, die fast die Hälfte der Bakterienpopulation in MC und CU Proben umfassten, waren *Bacteroidetes* (46% MC und 49% CU), gefolgt von *Firmicutes* (15% MC und 25% CU) und die Klassen *Betaproteobacteria* (18% MC und 7% CU) und *Gamma*proteobacteria (14% MC und 13% CU). Die Stämme *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* und *Deinococcus-Thermus* waren nur in einzelnen Proben gehäuft.

Morbus Crohn

Die 54 Biopsien der 26 MC-Patienten wurden nach deren Krankheitsaktivität (CDAI) in drei Kategorien zugeordnet: 1: „Remission“ (CDAI 0-150), 2: „moderate Aktivität“ (CDAI 151-220) und 3: „hohe Aktivität“ (CDAI 221-450) (**Abb.15**).

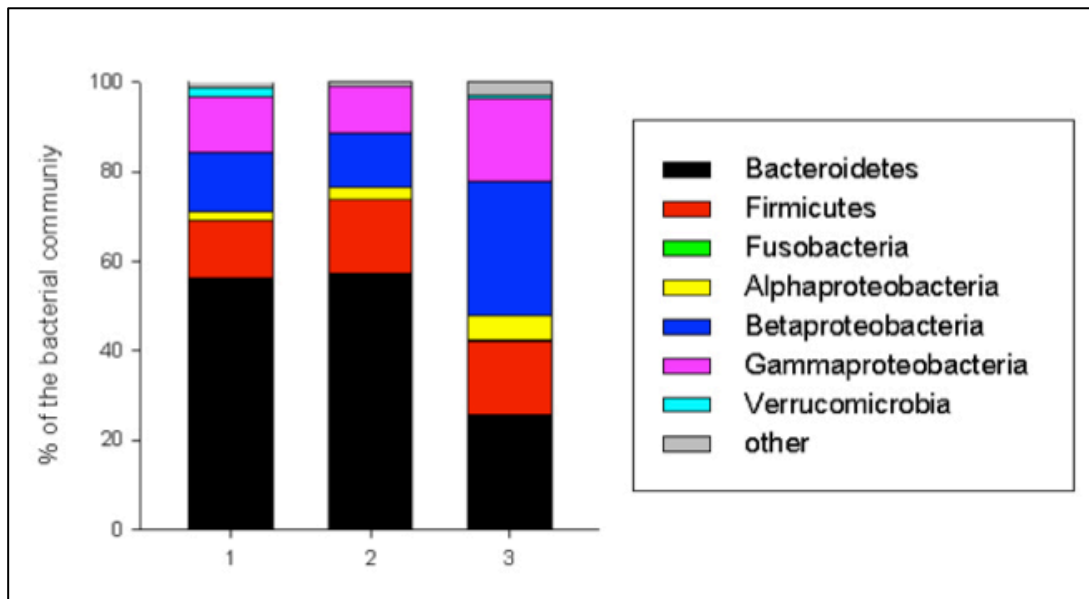


Abbildung 15: Bakterienzusammensetzung in MC Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität. Auf der x-Achse ist die Krankheitsaktivität, gemessen mit dem CDAI, in 3 Schweregrade eingeteilt. 1: „Remission“ (CDAI 0-150) (n=18), 2: „moderate Krankheitsaktivität“ (CDAI 151 – 220) (n=18), 3: „hohe Krankheitsaktivität“ (CDAI 221 – 450) (n=18). Auf der y-Achse ist die Bakteriengemeinschaft in Prozent aufgetragen.

In MC zeigt sich eine Reduktion der Menge an *Bacteroidetes* bei „hoher Krankheitsaktivität“, während die Anzahl der *Bacteroidetes* in „Remission“ und „moderater Krankheitsaktivität“ ähnlich ist. Die Anzahl der *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* und *Gammaproteobacteria* ist im Vergleich zur „Remission“ und „moderaten Krankheitsaktivität“ in der „hohen Krankheitsaktivität“ erhöht. Die Anzahl der *Firmicutes* bleibt in den verschiedenen Krankheitsstrata ähnlich. Die Proben der Kategorien „Remission“ (CDAI 0-150) und „moderaten Krankheitsaktivität“ (CDAI 151-220) waren sich ähnlich. Jedoch zeigte sich ein großer Unterschied der mukosa-assoziierten bakteriellen Zusammensetzung in der Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450) verglichen mit den anderen Kategorien der Krankheitsaktivität.

Die folgende Abbildung zeigt die Bakterienzusammensetzung jeder einzelnen Biopsie der MC Patienten in den drei Kategorien der Krankheitsaktivität (**Abb.16**).

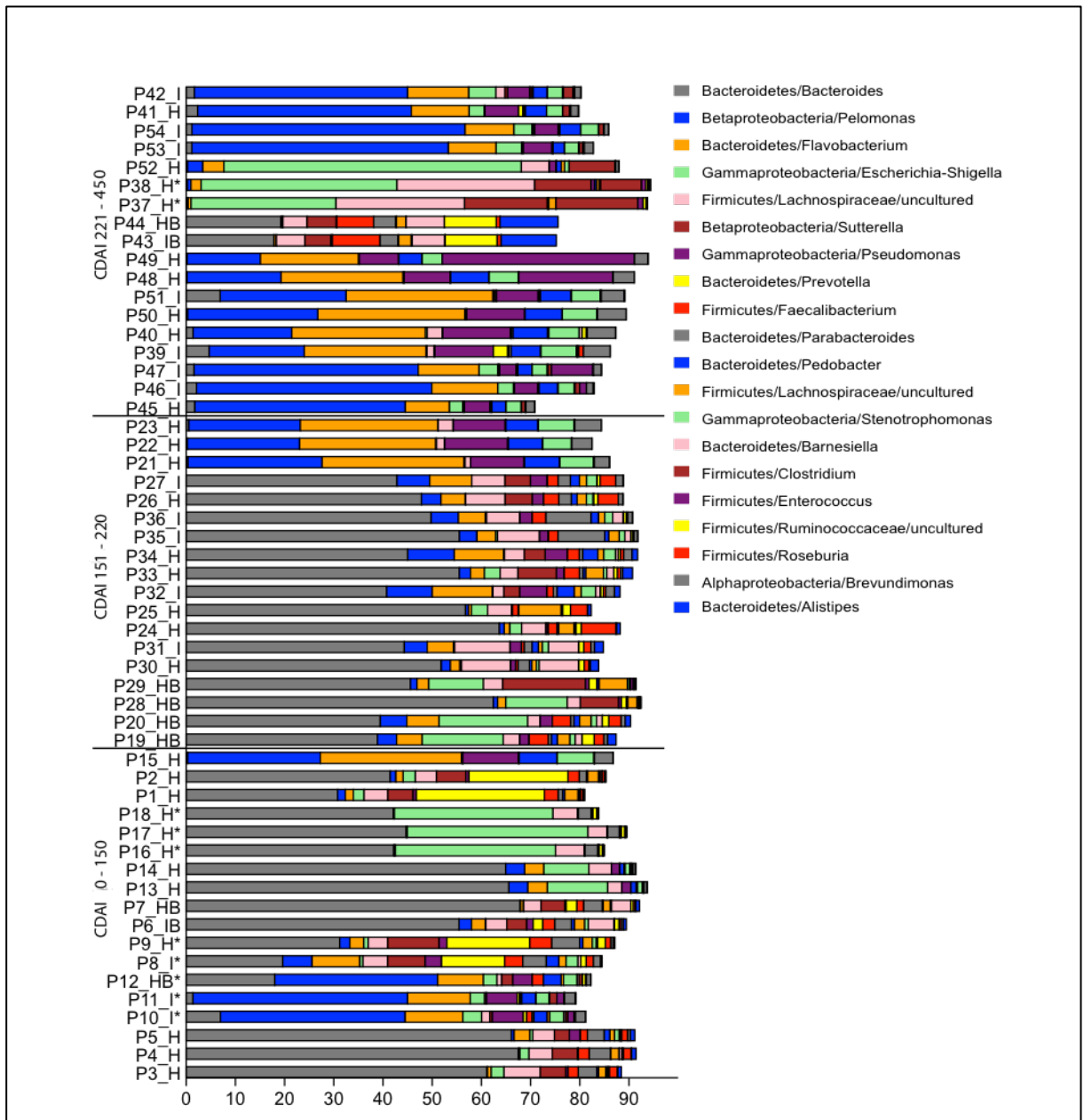


Abbildung 16: Bakterienzusammensetzung gemessen anhand der Bakteriengattungen in MC Biopsieproben. Die Krankheitsaktivität wurde mit dem Crohn's Disease Activity Index (CDAI) bestimmt. P= Biopsie (siehe Tabelle 4 für die Zuordnung der Biopsienummer zum MC Patient); H= Gesund; I= Entzündet; B= Behandlung mit Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) Inhibitor; * Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) Gen Mutation.

Die Bakterienzusammensetzung in den einzelnen Biopsien der MC Patienten, eingeteilt nach Krankheitsaktivität, zeigt einige Ähnlichkeiten in den 3 Krankheitskategorien (Abb.16). Dabei ähneln sich die Kategorien „Remission“ (CDAI 0-150) und „moderate Krankheitsaktivität“ (CDAI 151-220) in der Bakterienzusammensetzung, während sich die

Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450) von den beiden Kategorien in der Bakterienzusammensetzung stark unterscheidet. Eine Ausnahme bilden die Patienten 6 (P10/11) und 19 (P15) aus der Kategorie „Remission“ (CDAI 0-150), deren Mukosa-assoziierte Bakterienflora eher denen der Kategorie einer „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450) gleicht. Der Patient 21 (P21/22/23) aus der Kategorie der „moderaten Krankheitsaktivität“ (CDAI 151-220) ähnelt ebenfalls in seiner Bakterienzusammensetzung eher denen aus der Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450). Die Patienten 10 (P43/44), 13 (P37/38) und 18 (P52) der Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450) unterscheiden sich in ihrer Bakterienzusammensetzung von den anderen Biopsien ihrer Kategorie. In der Abbildung 16 lassen sich Unterschiede zwischen Biopsien aus entzündeter und nicht-entzündeter Mukosa beobachten. Es fällt auch auf, dass in der Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ mehr Biopsien aus entzündeter Lokalisation vorhanden sind, die sich stark in ihrer Bakterienzusammensetzung von denen aus der Kategorie „Remission“ und „moderater Krankheitsaktivität“ unterscheiden.

Um die Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung hinsichtlich der Krankheitsaktivität beurteilen zu können, visualisierten wir die Unterschiede der bakteriellen Zusammensetzung auf der bakteriellen Gattungsebene mit dem „non-metric multidimensional scaling“ (NMDS) **(Abb.17).**

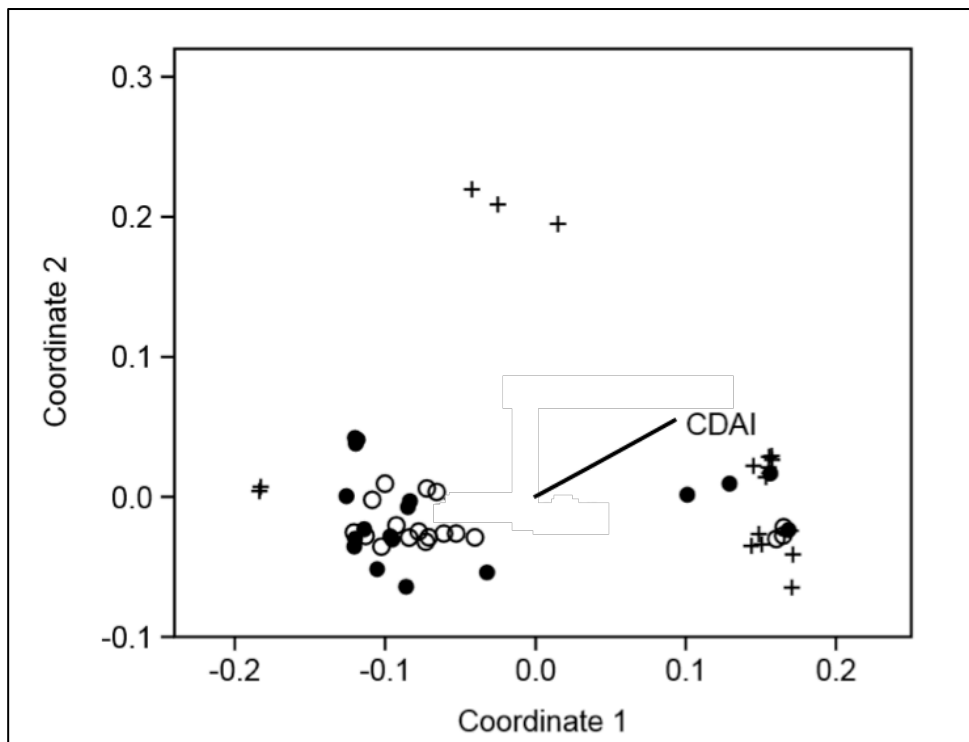


Abbildung 17: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienflora in MC Patienten (n=54) (NMDS stress 0,11). (●) repräsentieren Biopsien von MC Patienten mit einem CDAI von 0-150, (○) repräsentieren Biopsien mit einem CDAI von 151-220 und (+) repräsentieren Biopsien mit einem CDAI von 221-240.

Die Bakteriengemeinschaften wurden auf der ersten Koordinate abhängig davon, ob sie von Patienten mit niedrigem CDAI oder hohem CDAI gewonnen wurden, aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Analyse der Unterschiede der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in den verschiedenen Kategorien der Krankheitsaktivität mit Hilfe des Bray-Curtis dissimilarity index in einem one-way PERMANOVA Test vorgenommen. Die Bakterienzusammensetzung zwischen den Kategorien der Krankheitsaktivität war signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$).

Dieses Ergebnis deutet einen Zusammenhang zwischen der Bakterienzusammensetzung und der Krankheitsaktivität an, d.h. die Bakterienzusammensetzung unterscheidet sich in einem Stadium der Remission signifikant von der Bakterienzusammensetzung in einem hoch aktiven Morbus Crohn.

Colitis ulcerosa

Die 13 Biopsien der 7 CU-Patienten wurden anhand ihrer Krankheitsaktivität, gemessen mit dem Mayo-Score, in 2 Kategorien aufgeteilt: 1: „Remission“ (Mayo Score 0-5) und 2: „hohe Aktivität“ (Mayo Score ≥ 6) (**Abb.18**).

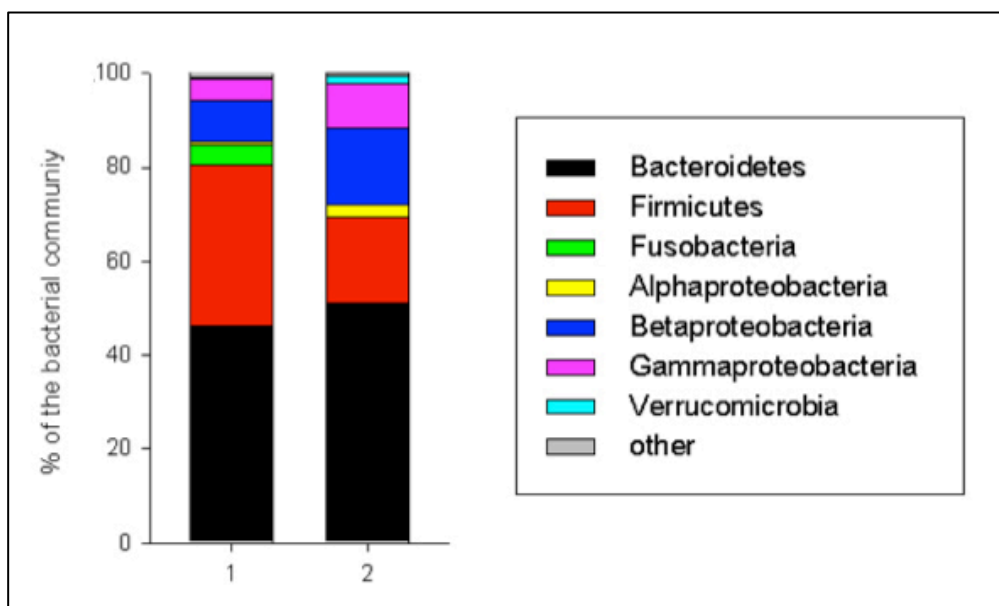


Abbildung 18: Bakterienzusammensetzung in CU Patienten eingeteilt nach Krankheitsaktivität. Auf der x-Achse ist die Krankheitsaktivität, gemessen mit dem Mayo-Score, in 2 Schweregrade eingeteilt. 1: „Remission“ Mayo Score 0 –

5 (n=6), 2: „hohe Aktivität“ Mayo Score ≥ 6 (n=7). Auf der y-Achse ist die Bakteriengemeinschaft in Prozent aufgetragen.

Die Anzahl der Bacteroidetes unterscheidet sich nicht stark zwischen den beiden Kategorien der Krankheitsaktivität. In CU steigt die Zahl der Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria und Gammaproteobacteria mit einer höheren Krankheitsaktivität. Die Anzahl der Firmicutes sinkt mit steigender Krankheitsaktivität.

Der Einfluss der Krankheitsaktivität, gemessen nach Mayo Score, auf die Bakterienzusammensetzung in CU Patienten wurde ebenfalls mit NMDS (Abb.19) dargestellt.

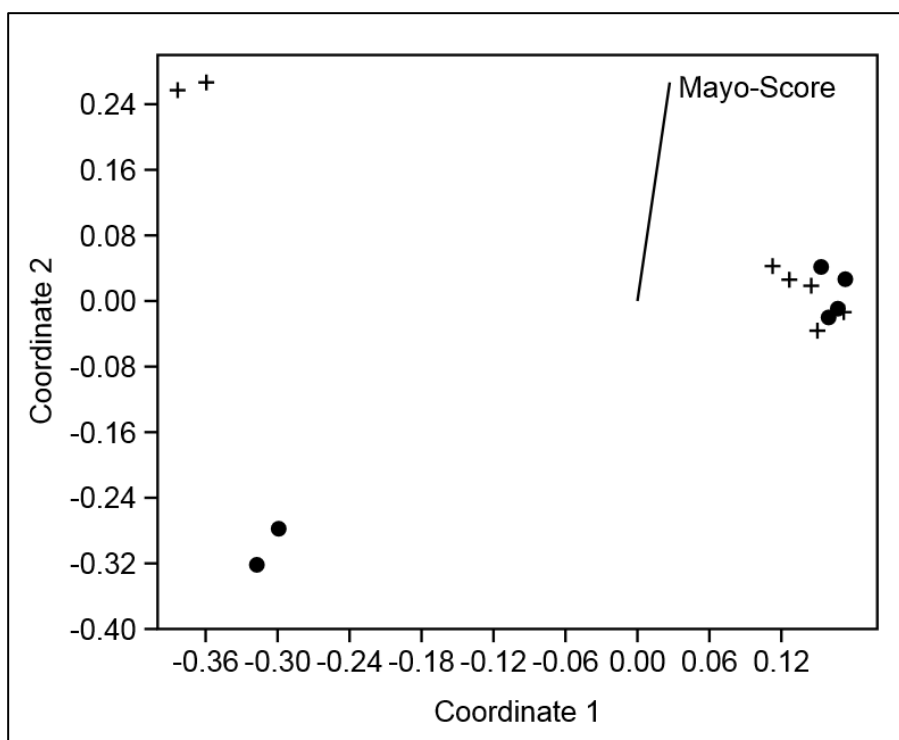


Abbildung 19: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in CU (n = 13) (NMDS stress 0.1). (●) repräsentieren Biopsien von CU Patienten der Kategorie 1 mit einem Mayo-Score von 0-5 und (+) repräsentieren Biopsien von CU Patienten der Kategorie 2 mit einem Mayo score ≥ 6 . Die schwarze Linie zeigt den Einfluss der Krankheitsaktivität (Mayo score) auf die Bakterienzusammensetzung.

Im Gegensatz zu den Biopsien von MC Patienten zeigte sich in den Biopsien von CU Patienten keine signifikanten Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung bei „Remission“ oder „hoher Krankheitsaktivität“.

4.5 Bakterielle Gattungen mit erhöhter Abundanz in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität bei MC

Aus klinischer Sicht wäre es von großem Interesse, besondere bakterielle Gattungen, welche repräsentativ für eine bestimmte Krankheitsaktivitätskategorie sind, zu identifizieren. Um solch einen Zusammenhang zu identifizieren, wurden die Unterschiede in der Bakteriengemeinschaft mit Hilfe von LEfSe (Segata et al., 2011) charakterisiert.

Da die Unterschiede zwischen den Kategorien der Krankheitsaktivität erheblich waren (**Tabelle 7**), stratifizierten wir die Daten anhand der drei Kategorien. LEfSe vergleicht als Erstes die Daten mit einem nicht-parametrischem Test (Kruskal-Wallis mit $\alpha = 0,05$). Die Ergebnisse werden dann zwischen den Kategorien mit dem Wilcoxon Rangtest ($\alpha = 0,05$) verglichen. Anschließend werden signifikante Unterschiede mit der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) untersucht (Logarithmischer Wert 2.0), um OTUs, also Gruppen gemessen an ihrer Sequenz-Ähnlichkeit, mit einer signifikant höheren Häufung den drei Kategorien zuzuordnen. Eine (LDA) „effect size LEfSE analysis“ (Segata et al., 2011)) wurde durchgeführt, um Bakteriengruppen, die sich stark zwischen den Proben unterscheiden, zu identifizieren. Für die Multi-Klassen Analyse wurde die „default“ Einstellung ohne die „One against all“ Strategie genutzt.

Tabelle 7: Anzahl (>0.1%) der bakteriellen Gattungen mit einer signifikant erhöhten Bakterienhäufung in verschiedenen Krankheitsaktivitäten-Stufen bei MC

CDAI (<150)	CDAI (151-220)	CDAI (221-450)	Bacterial genus
0.10 (0.14)	0.02 (0.03)	0 (0.04)	" <i>Bacteroidales S24-7 group</i> "
0.10 (0.17)	0.05 (0.08)	0 (0.03)	<i>Dorea</i>
0.16 (0.47)	0.00 (0)	0 (0.02)	"uncultured <i>Coriobacteriaceae</i> "
0.37 (0.60)	0.23 (0.23)	0.04 (0.09)	<i>Anaerostipes</i>
0.10 (0.25)	0.13 (0.27)	0.01 (0.02)	<i>Megasphaera</i>
0.12 (0.28)	0.25 (0.42)	0.08 (0.20)	<i>Haemophilus</i>

0.18 (0.16)	0.25 (0.20)	0.04 (0.07)	<i>Flavonifractor</i>
0.11 (0.17)	0.35 (0.31)	0.01 (0.02)	<i>Veillonella</i>
0.41 (0.68)	0.44 (1.05)	0.04 (0.07)	<i>Pseudobutyrvibrio</i>
0.16 (0.16)	0.65 (1.70)	0.02 (0.03)	"uncultured <i>Erysipelotrichaceae</i> "
0.41 (0.39)	0.70 (0.71)	0.16 (0.20)	<i>Blautia</i>
0.54 (0.57)	1.51 (1.88)	0.18 (0.30)	<i>Roseburia</i>
0.99 (0.87)	2.16 (2.13)	0.43 (0.71)	"uncultured <i>Lachnospiraceae</i> "
3.73 (1.92)	4.92 (2.92)	4.26 (8.34)	"uncultured <i>Lachnospiraceae</i> "
40.24 (23.49)	41.00 (20.06)	3.43 (5.55)	<i>Bacteroides</i>
0.03 (0.05)	0.04 (0.04)	0.11 (0.19)	<i>Paucibacter</i>
0.03 (0.05)	0.08 (0.08)	0.14 (0.14)	<i>Ralstonia</i>
0.05 (0.11)	0.02 (0.03)	0.15 (0.13)	<i>Aquabacterium</i>
0.09 (0.16)	0.08 (0.09)	0.23 (0.21)	<i>Arthrobacter</i>
0.07 (0.11)	0.10 (0.14)	0.28 (0.03)	<i>Acidovorax</i>
0.30 (0.39)	0.26 (0.32)	0.39 (1.42)	<i>Coproccoccus</i>
0.17 (0.22)	0.22 (0.25)	0.42 (0.32)	<i>Sphingobacterium</i>
0.23 (0.61)	0.01 (0.03)	0.46 (0.63)	<i>Nocardioides</i>
0.41 (0.78)	0.22 (0.25)	0.96 (0.87)	<i>Sediminibacterium</i>
0.67 (1.15)	0.51 (0.61)	1.44 (1.24)	<i>Sphingomonas</i>
0.30 (0.54)	0.13 (0.11)	1.50 (3.81)	<i>Thermus</i>

0.76 (0.99)	1.31 (1.44)	2.20 (2.04)	<i>Brevundimonas</i>
5.17 (7.12)	8.65 (9.34)	13.36 (10.22)	<i>Flavobacterium</i>
8.94 (14.56)	7.32 (8.12)	25.30 (19.64)	<i>Pelomonas</i>

Tabelle 7 zeigt die durchschnittliche relative Bakterienhäufung in den drei Kategorien der Krankheitsaktivität: „Remission“ (CDAI 0-150), „moderate Aktivität“ (CDAI 151-220) und „hohe Aktivität“ (CDAI 221-450). Stark erhöhte Bakterienmengen sind fett markiert.

Unter den häufig vorkommenden Bakterien (> 0,1% im Durchschnitt), die in Biopsien von Patienten in „Remission“ identifiziert wurden, waren *Anaerostipes* (*Clostridia*) und unkultivierte *Coriobacteriaceae* (*Actinobacteria*). *Bifidobakterien* waren auch signifikant angereichert, aber gering in der Menge. In der Kategorie der „moderaten Krankheitsaktivität“ (CDAI 151-220) konnte eine relativ große Zahl an *Lachnospiraceae* (*Firmicutes*), unter denen *Roseburia*, *Blautia*, *Pseudobutyrvibrio* und andere unkultivierte *Lachnospiraceae* waren, identifiziert werden. Zusätzlich wurden andere *Firmicutes* (*Megasphaera*, *Flavonifractor*, *Veillonella*, unkultivierte *Erysipelotrichaceae*) und *Haemophilus* (*Gammaproteobacteria*) analysiert. Jedoch war das am Häufigsten vorkommende Bakterium in dieser Gruppe der Gattung *Bacteroides* (*Bacteroidetes*) zu zuordnen, welches eine sehr große Häufung in einigen Proben hatte. Die Kategorie der „hohen Krankheitsaktivität“ (CDAI 221-450) wurde von *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*) dominiert, welche zu den Gattungen *Pelobacter*, *Paucibacter*, *Aquabacterium*, *Acitovorax* und *Ralstonia* gehört. Unter den häufig vorkommenden Bakterien waren auch *Flavobacterium*, *Brevundimonas* und *Sphingomonas*. Unter den *Lachnospiraceae* wurden ausschließlich *Coprococcus* identifiziert. In der MC Kohorte änderte sich die Menge der *F. prausnitzii* (*Firmicutes*) nicht signifikant in den verschiedenen Kategorien der Krankheitsaktivität. Die Bakteriengattungen *Blautia* und *Roseburia* zeigten eine hohe Häufung in der MC Kohorte mit „moderater Aktivität“ (CDAI 151-220).

4.6 Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen Charakteristika und der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in MC Patienten

Zusätzlich zur Krankheitsaktivität (CDAI) wurde auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Mukosa- assoziierten Bakterienzusammensetzung und TNF- α - Inhibitor-Therapie, Entzündungsstatus der Biopsie und Vorliegen einer Mutation im *NOD2*-Gen untersucht. Die Unterschiede in der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung bei den oben genannten Parametern wurden statistisch mit dem one-way PERMANOVA ausgewertet.

TNF- α . Die parallele Richtung und Länge der Vektoren für den CDAI und die TNF- α -Inhibitor-Therapie in Abbildung 20 zur ersten Koordinate zeigen einen starken gegenteiligen Effekt dieser Faktoren auf die Bakterienzusammensetzung. MC Patienten mit TNF- α -Inhibitor-Therapie zeigen eine signifikant unterschiedliche Bakterienzusammensetzung ($p=0,02$) im Vergleich zu MC Patienten ohne ohne TNF- α -Inhibitor-Therapie. Die entgegengesetzte Richtung der Krankheitsaktivität (CDAI) und der TNF- α -Inhibitor-Therapie im NMDS Plot (**Abb.20**) sprechen für einen positiven Einfluss der Therapie auf die Bakterienzusammensetzung.

Entzündungsstatus. In unserer Kohorte waren die Bakteriengemeinschaften, die in makroskopisch entzündeter und makroskopisch gesunder Mukosa gefunden wurden, gering, jedoch mit ($p=0,03$) noch signifikant. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Krankheitsaktivität (CDAI) auf die Mukosa-assoziierte Bakteriengemeinschaft stärker ist als der lokale Entzündungsstatus ist.

***NOD2*-Gen.** Es ergab sich ein nicht-signifikante Assoziation zwischen dem Nachweis einer *NOD2*-Gen-Mutation und der Bakterienzusammensetzung ($p=0,12$).

Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung wurden anhand einer NMDS mit Bray-Curtis dissimilarity und der PAST Software Version 3.08 (Hammer, 2001) analysiert (**Abb.20**).

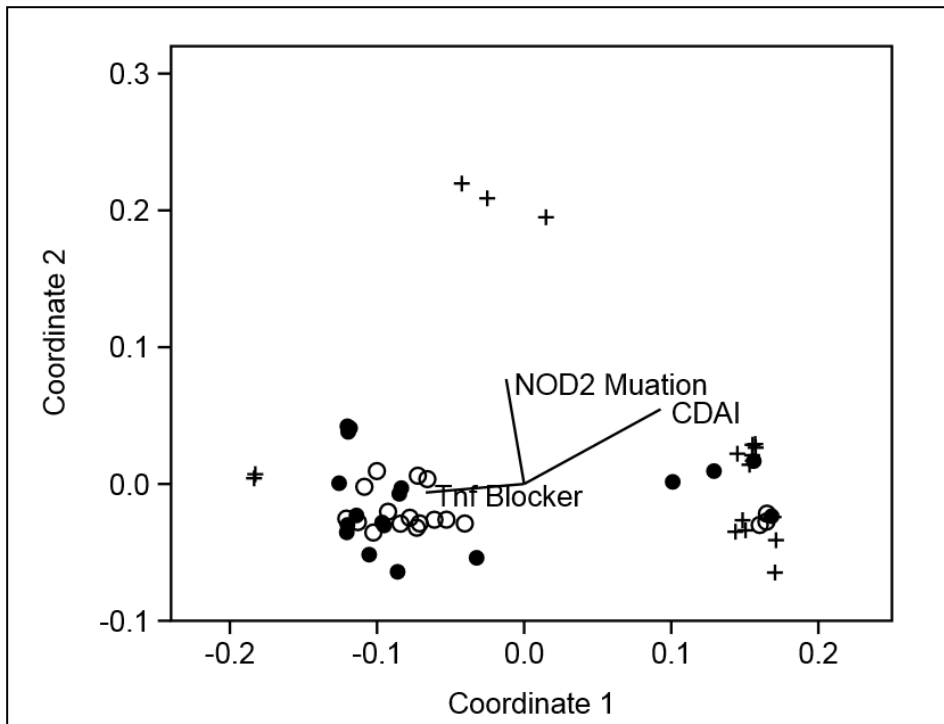


Abbildung 20: NMDS Analyse der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung in MC Patienten (n = 54) (NMDS stress 0.11). (●) repräsentieren Biopsien von MC Patienten mit einem CDAI von 0-150, (○) repräsentieren Biopsien mit einem CDAI von 151-220 und (+) repräsentieren Biopsien mit einem CDAI von 221-240.

In MC zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der Bakterienzusammensetzung und der Krankheitsaktivität (CDAI) ($p < 0.01$). Es wurde auch eine Korrelation für eine TNF- α -Inhibitor Therapie ($p = 0.02$) und dem mukosalen Entzündungsstatus ($p = 0.03$) gefunden. Zwischen der Bakterienzusammensetzung und dem Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation gab es einen nicht signifikanten Zusammenhang ($p = 0.08$).

Die Vektoren für den CDAI, den TNF- α -Inhibitor und die *NOD2*-Mutation wurden anhand des Verlaufs der Koordinaten der Biopsien hinzugefügt und repräsentieren die Korrelationskoeffizienten zwischen diesen Faktoren und den NMDS Werten.

5. Diskussion

Verschiedene Studien aus den letzten Jahren konnten eine veränderte Darmflora in CED Patienten nachweisen (Sokol et al., 2006; Frank et al., 2007; Peterson et al., 2008; Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009). Die Auswirkungen dieses mikrobiellen Ungleichgewichts, welches auch Dysbiose genannt wird, auf das intestinale Immunsystem und die Veränderungen, die zu einer CED führen, sind allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der Mukosa-assoziierten Darmbakterien in CED in verschiedenen klinischen Situationen genauer zu charakterisieren. Es wurde auf einen Zusammenhang der intestinalen Bakterienzusammensetzung von CED Patienten zur Krankheitsaktivität (CDAI, Mayo-Score), zu einer TNF- α -Inhibitor Therapie und zu einer potentiell vorliegenden *NOD2*-Mutation untersucht. Es erfolgte auch eine Unterscheidung der Biopsien nach der lokalen Inflammation (makroskopisch entzündete und makroskopisch nicht-entzündete Mukosa) und die Untersuchung eines Einflusses auf die Bakterienzusammensetzung.

Die vorliegenden Daten zeigen einen starken Zusammenhang zwischen der Mukosa-assoziierten Bakterienzusammensetzung und der Krankheitsaktivität in MC-Patienten. Es wurden auch spezielle Bakteriengattungen, die in den verschiedenen CDAI-Kategorien („Remission“, „moderate Aktivität“, „hohe Aktivität“) besonders häufig vorkamen, gefunden (**Tabelle 7**). Ob in CED die Veränderung der Bakterienzusammensetzung zu einer Entzündung führt oder ob erst die Entzündung der Schleimhaut eine veränderte Darmflora auslöst, ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Arbeiten konnte eine verringerte Anzahl an *F. prausnitzii* in CED aufgezeigt werden (Swidsinski et al., 2002; Sokol et al., 2008; Sokol et al., 2009). In unserer Studie gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der *F. prausnitzii* in den verschiedenen CDAI Kategorien. *F. prausnitzii* scheint antientzündliche Funktionen *in vitro* als auch *in vivo* zu haben (Sokol et al., 2008). *R. hominis* und *F. prausnitzii* sind beide Butyrat produzierende Stämme (Machiels et al., 2014), welche eine wichtige Rolle in der Regulation der regulatorischen T-Zell Homöostase des Kolons spielen könnten (Smith et al., 2013). In einer Studie mit CU Patienten (Machiels et al., 2014) hat die Verminderung von *R. hominis* und *F. prausnitzii* umgekehrt mit der Krankheitsaktivität korreliert. Willing et al. (Willing et al., 2010) entdeckten eine Reduktion von *Roseburia* in ilealen MC Patienten, verglichen zu gesunden Kontrollen. Eine weitere Studie konnte eine Verbindung zwischen einer verminderten Menge an *Blautia* und

Roseburia in CU Patienten vor Kolektomie und dem erhöhten Risiko einer Pouchitis nach einer Ileoanal Pouch Anastomose beschreiben (Machiels et al., 2015). In unserer Studie hatten die Bakteriengattungen *Blautia* und *Roseburia* eine hohe Abundanz in der MC Kohorte mit „moderater Krankheitsaktivität“ (CDAI 151-220). Es bleibt auf der Basis des aktuellen Standes der Forschung unklar, ob diese Bakterien eine antientzündliche Funktion haben und daher wegen der Entzündung vermehrt in der „moderaten“ MC Gruppe vertreten sind und ob sie vorteilhaft in Patienten mit „hoher Krankheitsaktivität“ sein könnten. Ein Mausmodell wäre nötig, um diese Hypothese zu testen.

Im Gegensatz zu anderen Studien (Eckburg et al., 2005; Frank et al., 2007) zeigten die Ergebnisse unserer Kohorte eine Dominanz der *Bacteroidetes* über *Firmicutes*. Allerdings zeigte die Studie von Frank et al. (2007) eine Reduktion der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* und eine Ausbreitung der *Proteobacteria* in CED. Momozawa et al. (2011) zeigte, dass die DNA Isolierung einen Einfluss auf die Effizienz des Nachweises von *Bacteroidetes* hat. Vorherige Publikationen zeigten eine niedrigere mikrobielle Diversität in CED Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (Ott et al., 2004; Manichanh et al., 2006; Frank et al., 2007; Willing et al., 2010; Tong et al., 2013). Allerdings verglichen diese Studien gesunde mit erkrankten Patienten, wobei unsere Studie auf den Einfluss der bakteriellen Zusammensetzung in verschiedenen klinischen Situationen erkrankter CED Patienten fokussiert ist.

Der natürliche Verlauf der CED besteht aus wechselnden Phasen der Aktivität und der Remission (Baumgart, 2009; Cosnes et al., 2011). Das bessere Verständnis zwischen der Zusammensetzung der Mukosa-assoziierten Darmbakterien mit dem Auftreten CED-typischer Entzündungsschübe, könnte neue therapeutische Ansätze hervorbringen. Diese Erkenntnisse könnten auch zu der Entwicklung spezieller probiotischer Behandlungen oder besseren Überwachungsmethoden der Erkrankung führen. Da der Krankheitsverlauf und mögliche zukünftige Krankheitsschübe in CED nicht vorhersagbar sind, können diese Bakterien zukünftig möglicherweise als Anzeichen für einen schwereren Krankheitsverlauf oder als bakterielle Marker für einen bevorstehenden Schub in MC herangezogen werden. Auch ein pathophysiologischer Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung und dem Krankheitsverlauf erscheint möglich. Die Rolle dieser „Markerbakterien“ müsste jedoch noch in prospektiven Studien überprüft werden.

Die Rolle einer Stuhltransplantation bei CED ist noch nicht endgültig geklärt, die aktuelle Datenlage spricht zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch gegen einen routinemäßigen Einsatz

dieser Methode. Möglicherweise könnte jedoch in einem hoch-aktiven MC die Wiederherstellung einer „gesunden“ Darmflora, also der Darmflora, welche vor Ausbruch der Erkrankung vorherrschte, die Krankheitsaktivität vermindern. Hierzu müsste jedoch eine Charakterisierung der mikrobiellen Flora vor Ausbruch der Erkrankung bzw. in Remission durchgeführt werden. Die Veränderungen der Darmflora in CED Patienten unterscheiden sich in einigen Arbeiten, was den verschiedenen Parametern, nach denen die Studien gestaltet sind, geschuldet sein könnte. Die Proben unterscheiden sich, ob sie aus Stuhl oder Mukosabiopsie entstammen, dem Entzündungsgrad des Gewebes bei Biopsieentnahme, und dem Bereich der GI-Traktes, da sich die Zusammensetzung und Anzahl der luminalen und Mukosa-assoziierten Darmbakterien entlang des Verdauungstraktes ändert (Gu et al., 2013; Peterson et al., 2008). Die Krankheitsaktivität, Methodik der Probenanalyse und individuellen Charakteristika der Patienten wie Medikation, Diät, Alter, Genetik und Herkunft müssen berücksichtigt werden. Eine Standardisierung der Studiengestaltung würde zu einer besseren Vergleichbarkeit führen.

Eine Studie von Rehman et al. (2011) postulierte, dass *NOD2* eine wichtige Rolle für die intestinale bakterielle Komposition spielt und dass einige Mutationen mit einem bestimmten mikrobiellen Profil assoziiert waren. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht verifiziert werden. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Mutation im *NOD2*-Gen und der Bakterienzusammensetzung. Im Gegensatz zu der Studie von Rehman et al. (2011), die eine Gruppe von Patienten untersuchte, die homozygot für die SNP13 waren, konnte die vorliegende Studie auf eine Kohorte mit höherer genetischer Diversität des *NOD2*-Gens zurückgreifen, so wurden auch Patienten mit SNP8 und SNP12 in die Analysen mit einbezogen. Dies könnte auf einen möglichen Unterschied der Bedeutung der verschiedenen Mutationen auf die Pathogenese von MC hindeuten (Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001). Möglicherweise besitzt der *NOD2*-Rezeptor eine stärkere Funktion im Ileum von MC Patienten (Wehkamp et al., 2004; Wehkamp et al., 2005), wobei unsere Biopsien nur aus Bereichen des Kolons stammen. Grund für diesen nicht-signifikanten Zusammenhang könnte auch sein, dass nur ein geringer Teil der MC Patienten eine *NOD2*-Mutation aufweist. Eine Erhöhung der Zahl der Probanden wäre hier ausschlaggebend, um eine abschließende Aussage über den Zusammenhang des *NOD2*-Gens mit einer veränderten Bakterienflora zu treffen. Um weiter aufzuklären, ob die Entzündung durch die veränderte Darmflora ausgelöst wird oder vice versa, ist eine größere Gruppe an Patienten mit *NOD2*-Mutationen erforderlich. Zusätzlich müssten auch nicht-CED Patienten mit *NOD2*-Mutation

auf ihre intestinale Bakterienzusammensetzung untersucht werden, was jedoch schwierig zu realisieren sein dürfte. Da Mutationen im *NOD2*-Gen nicht mit der Pathogenese von CU assoziiert sind (Silverberg et al., 2009), wurden in der vorliegenden Studie die CU Patienten nicht auf das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation untersucht.

Die Auswirkung einer TNF- α -Inhibitor Behandlung auf die mikrobielle Zusammensetzung wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. In einer Studie von Rajca et al (2014) konnte nach Unterbrechung einer IFX Therapie eine Wiederkehr einer Dysbiose, hier definiert als Verringerung von *Bacteroides*, *F. prausnitzii* und *C. coccoides*, festgestellt werden. In einer anderen Studie von Wills et al. (2014) konnte ein Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Thiopurinen und der Bakterienzusammensetzung und Vielfaltigkeit in Stuhlproben von CED Patienten festgestellt werden. In unserer Studie zeigten die MC Patienten eine signifikante Korrelation der Bakterienzusammensetzung mit einer TNF- α -Inhibitor Behandlung. Zudem sprechen die entgegengesetzte Richtung des Vektors für Krankheitsaktivität (CDAI) und des Vektors für TNF- α -Inhibitor Behandlung in dem NMDS Plot für einen positiven Effekt der Behandlung auf die bakterielle Zusammensetzung. Dies könnte bedeuten, dass die TNF- α -Inhibitor Therapie die Bakterienzusammensetzung im Darm auf eine remissionstypische Bakterienzusammensetzung zurückführt. Allerdings lässt die geringe Anzahl an Patienten mit TNF- α -Inhibitor-Therapie keine abschließenden Schlussfolgerungen zu.

Auffällig ist allerdings, dass der Einfluss der Krankheitsaktivität (CDAI) auf die Mukosa-assoziierte Bakterienzusammensetzung sehr viel stärker als der lokale Entzündungsgrad ist. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann jedoch nicht abgeleitet werden, ob die Mukosaentzündung erst zu einer Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung führt oder ob die veränderte Bakterienzusammensetzung als kausale Ursache zur Entstehung von intestinaler Inflammation führt. Anhand der Analyse der Mukosa-assoziierten Bakteriengemeinschaft aus den Biopsien konnte zwischen Entnahmeorten aus makroskopisch entzündetem und makroskopisch gesundem Gewebe unterschieden werden. Dies zeigt, dass das endoskopische Erscheinungsbild einer Läsion, z.B. eines Ulkus, einen signifikanten Einfluss auf die Mukosa-assoziierte Bakterienzusammensetzung hat.

Dies ist aus unserer Sicht die erste Studie, die einen klaren Zusammenhang zwischen Veränderung der Bakteriengemeinschaft in MC und der Krankheitsaktivität (CDAI) beschreibt.

Um zu klären, ob die intestinale Dysbiose die Ursache oder die Konsequenz der CED ist, wären Biopsien aus gesunden Patienten nötig, bevor sie eine CED entwickeln. In folgenden Verlaufsbiopsien könnte untersucht werden, ob die CED assoziierten Veränderungen der Darmflora über den Verlauf der Krankheit konstant bleiben oder sich kontinuierlich ändern.

Aus heutiger Sicht ist das therapeutische Ziel für die CED die Einleitung und Aufrechterhaltung einer Remission. Das langfristige Ziel sollte allerdings die Prävention und Heilung der CED als Fokus haben. Im Hinblick auf die Erforschung der mikrobiellen Zusammensetzung im Darm haben wir die Möglichkeit, mehr Verständnis für diese Erkrankung zu gewinnen, um das Ziel einer ursächlichen Therapie zu erreichen.

6. Zusammenfassung

Das intestinale Mikrobiom spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese und wohl auch im klinischen Verlauf der CED. Studien zeigen, dass Patienten mit CED eine veränderte intestinale Bakterienzusammensetzung im Vergleich zu gesunden Personen aufweisen und deuten eine gestörte Interaktion zwischen Bakterien und intestinalem Immunsystem an. In der vorliegenden Arbeit wurde die Mukosa-assoziierte Bakterienzusammensetzung des Darms von 26 MC Patienten und 7 CU Patienten mit Hilfe der 16S rRNA Genamplikon Sequenzierung analysiert. Bei diesen Patienten wurden während koloskopischer Untersuchungen Biopsien aus entzündeten und gesunden Schleimhautarealen entnommen. Die Patienten wurden nach ihrer Krankheitsaktivität mit dem CDAI für MC und dem Mayo-Score für CU stratifiziert und die Biopsien auf spezifische Veränderungen der Bakterienzusammensetzung hin untersucht. Es wurde weiterhin der Einfluss einer TNF- α -Blocker Behandlung, des mukosalen Entzündungsstatus und das Vorliegens einer *NOD2*-Mutation auf die intestinale Bakterienzusammensetzung bestimmt. In MC und CU ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Vielfalt der Bakteriengattungen in den verschiedenen Kategorien der Krankheitsaktivität. Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in der Abundanz spezifischer bakterieller Gattungen zwischen den Krankheitsschweregraden bei MC. Während die Bakteriengemeinschaft von MC Patienten in „Remission“ oder „moderater Aktivität“ von der Gattung *Bacteroides* (>40%) dominiert wurde, zeigte die Bakterienzusammensetzung bei „hoher Aktivität“ des MC eine Dominanz der *Pelomonas* (25%) und *Flavobacterium* (13%), und eine Reduktion der *Bacteroides* (4%). Dies deutet auf eine spezifische Abundanz bestimmter bakterieller Genera entlang der Krankheitsschwere hin. Es konnte ebenfalls ein starker Einfluss einer TNF- α -Blocker Behandlung und der lokalen mukosalen Inflammation auf die Bakteriengemeinschaft in MC beobachtet werden. Insgesamt lässt sich aus der Arbeit die Schlussfolgerung ziehen, dass eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung auf eine Veränderung in der Krankheitsaktivität in MC Patienten hindeutet. Eine Verschiebung der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung bei aktiven MC Patienten in Richtung der Zusammensetzung vor Manifestation der Erkrankung bzw. in Remission könnte eine Reduktion der Krankheitsaktivität herbeiführen und stellt somit einen potenziell vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Weitere Arbeiten müssen diesen Aspekt in prospektiven Studien untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in internationalen Fachzeitschriften publiziert:

Schäffler H, Herlemann DP, Alberts C, Kaschitzki A, Bodammer P, Bannert K, Köller T, Warnke P, Kreikemeyer B, Lamprecht G. Mucosa-attached bacterial community in Crohn's Disease coheres with the Clinical Disease Activity Index. *Environ Microbiol Rep.* 2016 Apr 15.

Schäffler H, Kaschitzki A, Alberts C, Bodammer P, Bannert K, Köller T, Warnke P, Kreikemeyer B, Lamprecht G. Alterations in the mucosa-associated bacterial composition in Crohn's disease: a pilot study. *Int J Colorectal Dis.* 2016 May;31(5):961-71.

7. Literaturverzeichnis

Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2066-78.

Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1729-37.

Agnholt J, Kaltoft K. Infliximab downregulates interferon-gamma production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Cytokine*. 2001 Aug 21;15(4):212-22.

Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review. *Dig Dis Sci*. 2015 Feb;60(2):290-8.

Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagacé C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lémann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panés J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinkas L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JJ, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annese V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK, Rioux JD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011 Mar;43(3):246-52.

An D, Oh SF, Olszak T, Neves JF, Avci FY, Erturk-Hasdemir D, Lu X, Zeissig S, Blumberg RS, Kasper DL. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):123-33.

Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol*. 2011 Apr;46(4):479-86.

Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010 Apr;51(4):1327-33.

Arora T, Padaki R, Liu L, Hamburger AE, Ellison AR, Stevens SR, Louie JS, Kohno T. Differences in binding and effector functions between classes of TNF antagonists. *Cytokine*. 2009 Feb;45(2):124-31.

Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):451-5.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariac G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):174-80.

Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011 Jan 21;331(6015):337-41.

Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):232-6.

Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, Waldner MJ, Atreya I, Neumann H, Hildner K, Hoffman A, Kiesslich R, Rink AD, Rau TT, Rose-John S, Kessler H, Schmidt J, Neurath MF. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14⁺ macrophages. *Gastroenterology*. 2011 Dec;141(6):2026-38.

Bäckhed F1, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915-20.

Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*. 2009 Feb;106(8):123-33.

Benucci M, Saviola G, Manfredi M, Sarzi-Puttini P, Atzeni F. Tumor necrosis factors blocking agents: analogies and differences. *Acta Biomed*. 2012 Apr;83(1):72-80.

Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Ann Surg*. 2000 Jan;231(1):38-45.

Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976 Mar;70(3):439-44.

Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1994 Jun;106(6):1455-66.

Brenmoehl J, Herfarth H, Glück T, Audebert F, Barlage S, Schmitz G, Froehlich D, Schreiber S, Hampe J, Schölmerich J, Holler E, Rogler G. Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med*. 2007 Sep;33(9):1541-8.

Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Oct;75(10):4801-5.

Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2007 Sep;102(9):2058-69.

Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Aug;50(8):942-51.

Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW 4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):259-63.

Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989 Dec;34(12):1841-54.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4516-22.

Caprioli F, Bosè F, Rossi RL, Petti L, Viganò C, Ciafardini C, Raeli L, Basilisco G, Ferrero S, Pagani M, Conte D, Altomare G, Monteleone G, Abrignani S, Reali E. Reduction of CD68+ macrophages and decreased IL-17 expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease strongly correlate with endoscopic response and mucosal healing following infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Mar-Apr;19(4):729-39.

Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1720-28.

Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2013 Jan 28;328(2):222-5.

Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):840-62.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D, Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):90-7.

Corridoni D, Arseneau KO, Cifone MG, Cominelli F. The dual role of nod-like receptors in mucosal innate immunity and chronic intestinal inflammation. *Front Immunol*. 2014 Jul 10;5:317.

- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
- Courth LF, Ostaff MJ, Mailänder-Sánchez D, Malek NP, Stange EF, Wehkamp J. Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 10;112(45):14000-5.
- Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, Huot L, Grandjean T, Bressenot A, Delanoye-Crespin A, Gaillot O, Schreiber S, Lemoine Y, Ryffel B, Hot D, Núñez G, Chen G, Rosenstiel P, Chamaillard M. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest*. 2013 Feb;123(2):700-11.
- Crohn BB. An historic note on ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1962 Mar;42:366-7.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med*. 2000 May;67(3):263-8.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1405-13.
- Dasgupta S, Kasper DL. Relevance of commensal microbiota in the treatment and prevention of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Oct;19(11):2478-89.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14691-6.
- Derer S, Till A, Haesler R, Sina C, Grabe N, Jung S, Nikolaus S, Kuehbach T, Groetzinger J, Rose-John S, Rosenstiel PC, Schreiber S. mTNF reverse signalling induced by TNF α antagonists involves a GDF-1 dependent pathway: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2013 Mar;62(3):376-86.

Di Sabatino A, Pender SL, Jackson CL, Prothero JD, Gordon JN, Picariello L, Rovedatti L, Docena G, Monteleone G, Rampton DS, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):137-49.

Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Järnerot G, Tysk C, Apajalahti J, Engstrand L, Jansson JK. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J*. 2008 Jul;2(7):716-27.

Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis*. 2001 Feb;7(1):68-77.

Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Büschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*. 1999 Jun;44(6):812-8.

Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012 Aug 7;18(29):3839-48.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8.

Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology*. 1985 Jun;88(6):1818-25.

Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1997 Apr;42(4):817-22.

Fishbein T, Novitskiy G, Mishra L, Matsumoto C, Kaufman S, Goyal S, Shetty K, Johnson L, Lu A, Wang A, Hu F, Kallakury B, Lough D, Zasloff M. NOD2-expressing bone marrow-derived cells appear to regulate epithelial innate immunity of the transplanted human small intestine. *Gut*. 2008 Mar;57(3):323-30.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21;104(34):13780-5.

Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E. Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol.* 2011 Sep;19(9):427-34.

Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Büning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossom A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1118-25.

Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013 Dec 19;504(7480):446-50.

Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vázquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, González A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* 2014 Mar 12;15(3):382-92.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8869-72.

- Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Veldhuyzen van Zanten SJ. Differences between tissue-associated intestinal microfloras of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov;44(11):4136-41.
- Gu S, Chen D, Zhang JN, Lv X, Wang K, Duan LP, Nie Y, Wu XL. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS One*. 2013 Oct 7;8(10):e74957.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.
- Guidi L, Felice C, Procoli A, Bonanno G, Martinelli E, Marzo M, Mocci G, Pugliese D, Andrisani G, Danese S, De Vitis I, Papa A, Armuzzi A, Rutella S. FOXP3⁺ T regulatory cell modifications in inflammatory bowel disease patients treated with anti-TNF α agents. *Biomed Res Int*. 2013;2013:286368.
- Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1767-73.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 2001; 4: 9 pp.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001 Jun 16;357(9272):1925-8.
- Hoivik ML, Moum B, Solberg IC, Cvancarova M, Hoie O, Vatn MH, Bernklev T; IBSEN Study Group. Health-related quality of life in patients with ulcerative colitis after a 10-year disease course: results from the IBSEN study. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Aug;18(8):1540-9.
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Schölmerich J, Andreesen R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):889-94.
- Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM, Socie G, Wolff D, Finke J, Fischer G, Jackson G, Rocha V, Hilgendorf I, Eissner G, Marienhagen J, Andreesen R. The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in

GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet*. 2008 Aug;35(4-5):381-4.

Holtmann MH, Douni E, Schütz M, Zeller G, Mudter J, Lehr HA, Gerspach J, Scheurich P, Galle PR, Kollias G, Neurath MF. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol*. 2002 Nov;32(11):3142-51.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.

Hultén L. Surgical treatment of Crohn's disease of the small bowel or ileocecum. *World J Surg*. 1988 Apr;12(2):180-5.

Hviid A, Svanström H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut*. 2011 Jan;60(1):49-54.

Inagaki-Ohara K, Yada S, Takamura N, Reaves M, Yu X, Liu E, Rooney I, Nicholas S, Castro A, Ware CF, Green DR, Lin T. p53-dependent radiation-induced crypt intestinal epithelial cells apoptosis is mediated in part through TNF-TNFR1 system. *Oncogene*. 2001 Feb 15;20(7):812-8.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12.

Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW,

Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H; International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):119-24.

Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1738-47.

Kau AL, Planer JD, Liu J, Rao S, Yatsunenko T, Trehan I, Manary MJ, Liu TC, Stappenbeck TS, Maleta KM, Ashorn P, Dewey KG, Houpt ER, Hsieh CS, Gordon JI. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 25;7(276):276ra24.

Kawalec P. Indirect costs of inflammatory bowel diseases: Crohn's disease and ulcerative colitis. A systematic review. *Arch Med Sci*. 2016 Apr 1;12(2):295-302.

Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Bose S, Scesney S, Xiong L, Hanzatian DK, Salfeld J, Sasso EH. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol*. 2009 May;131(2):308-16.

Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):661-73.

Kirchner S, Holler E, Haffner S, Andreesen R, Eissner G. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes. *Cytokine*. 2004 Oct 21;28(2):67-74.

Kirsner JB. Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 1988 Jun;10(3):286-97.

Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002 Sep;37(9):1034-41.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan 7;41(1):e1.

Knights D, Silverberg MS, Weersma RK, Gevers D, Dijkstra G, Huang H, Tyler AD, van Sommeren S, Imhann F, Stempak JM, Huang H, Vangay P, Al-Ghalith GA, Russell C, Sauk J, Knight J, Daly MJ, Huttenhower C, Xavier RJ. Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med*. 2014 Dec 2;6(12):107.

Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology*. 2014 May;146(6):1489-99.

Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics*. 2012 Oct;130(4):e794-803.

Lennard-Jones JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997 Apr;9(4):353-9.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):837-48.

Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006 Jul 1;22(13):1658-9.

Liu C, Xia X, Wu W, Wu R, Tang M, Chen T, Xu F, Cong Y, Xu X, Liu Z. Anti-tumour necrosis factor therapy enhances mucosal healing through down-regulation of interleukin-21 expression and T helper type 17 cell infiltration in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jul;173(1):102-11.

Liu H, Li M, Wang P, Wang F. Blockade of hypoxia-inducible factor-1 α by YC-1 attenuates interferon- γ and tumor necrosis factor- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *Cytokine*. 2011 Dec;56(3):581-8.

Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Daryani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JJ, Malekzadeh R, Westra HJ, Yamazaki K, Yang SK; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Franke A, Alizadeh BZ, Parkes M, B K T, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, Weersma RK. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015 Sep;47(9):979-86.

Liu TC, Stappenbeck TS. Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:127-48.

Ljung T, Axelsson LG, Herulf M, Lundberg JO, Hellström PM. Early changes in rectal nitric oxide and mucosal inflammatory mediators in Crohn's colitis in response to infliximab treatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Apr 15;25(8):925-32.

Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002 Mar;31(1):1-20.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1504-17.

Lord JD. Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 28;21(40):11236-45.

MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol.* 1990 Aug;81(2):301-5.

Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014 Aug;63(8):1275-83.

Machiels K, Sabino J, Vandermosten L, Joossens M, Arijis I, de Bruyn M, Eeckhaut V, Van Assche G, Ferrante M, Verhaegen J, Van Steen K, Van Immerseel F, Huys G, Verbeke K, Wolthuis A, de Buck Van Overstraeten A, D'Hoore A, Rutgeerts P, Vermeire S. Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. *Gut.* 2015 Sep 30. pii: gutjnl-2015-309398.

- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006 Feb;55(2):205-11.
- Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Oct;9(10):599-608.
- Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Jul;23(4):379-83.
- Martinez-Medina M, Garcia-Gil LJ. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014 Aug 15;5(3):213-27.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009 Oct 29;461(7268):1282-6.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 2008 May 29;453(7195):620-5.
- Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Duijn W, van der Zon AM, Hanemaaijer R, Verheijen JH, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Effect of the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase-proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Feb;13(2):200-10.
- Meusch U, Rossol M, Baerwald C, Hauschildt S, Wagner U. Outside-to-inside signaling through transmembrane tumor necrosis factor reverses pathologic interleukin-1beta production and deficient apoptosis of rheumatoid arthritis monocytes. *Arthritis Rheum*. 2009 Sep;60(9):2612-21.
- Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Tsukamoto H, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Okamura S, Fujita S, Harada M. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):376-92.
- Mizutani T, Akasaka R, Tomita K, Chiba T. Serial changes of cytokines in Crohn's disease treated with infliximab. *Hepatogastroenterology*. 2011 Sep-Oct;58(110-111):1523-6.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30.

Momozawa Y, Deffontaine V, Louis E, Medrano JF. Characterization of bacteria in biopsies of colon and stools by high throughput sequencing of the V2 region of bacterial 16S rRNA gene in human. *PLoS One*. 2011 Feb 10;6(2):e16952.

Moon C, Baldridge MT, Wallace MA, Burnham CA, Virgin HW, Stappenbeck TS. Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature*. 2015 May 7;521(7550):90-3.

Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, Kerner M, Campbell B, Hoffman A, Biesterfeld S, Flourie B, Saurin JC, Galle PR, Neurath MF, Watson AJ, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut*. 2011 Jan;60(1):26-33.

Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1991 Aug;32(8):913-7.

Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 May;18(5):968-84.

Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, Berkun Y, Ben-Horin S, Amariglio N, Bank I, Kloog Y, Rechavi G, Goldstein I. TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3570-81.

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):65-80.

Nguyen L, Burnett L. Automation of molecular-based analyses: a primer on massively parallel sequencing. *Clin Biochem Rev*. 2014 Aug;35(3):169-76.

Nielsen OH, Gionchetti P, Ainsworth M, Vainer B, Campieri M, Borregaard N, Kjeldsen L. Rectal dialysate and fecal concentrations of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1999 Oct;94(10):2923-8.

Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2013 Aug 22;369(8):754-62.

Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, Benno Y, Sugiyama T. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(2):180-6.

Nunes T, Bernardazzi C, de Souza HS. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. *Biomed Res Int*. 2014;2014:218493.

Nunes T, Fiorino G, Danese S, Sans M. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? *World J Gastroenterol*. 2011 Jun 14;17(22):2715-22.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.

Olesen CM, Coskun M, Peyrin-Biroulet L, Nielsen OH. Mechanisms behind efficacy of tumor necrosis factor inhibitors in inflammatory bowel diseases. *Pharmacol Ther*. 2016 Mar;159:110-9.

Olsen T, Cui G, Goll R, Husebekk A, Florholmen J. Infliximab therapy decreases the levels of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA in colonic mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(6):727-35.

Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol*. 2000 Oct;35(10):1075-81.

Ott C, Obermeier F, Thielers S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Sep;20(9):917-23.

Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004 May;53(5):685-93.

Peake ST, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α agents in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jun;19(7):1546-55.

Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*. 2008 Jun 12;3(6):417-27.

Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu YJ, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106(37):15813-8.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):417-29.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(21):7188-96.

Pugazhendhi S, Sahu MK, Subramanian V, Pulimood A, Ramakrishna BS. Environmental factors associated with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol*. 2011 Dec;30(6):264-9.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4; 464(7285): 59–65.

Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012 Jul 24;13:341.

Rajca S, Grondin V, Louis E, Vernier-Massouille G, Grimaud JC, Bouhnik Y, Laharie D, Dupas JL, Pillant H, Picon L, Veyrac M, Flamant M, Savoye G, Jian R, Devos M, Paintaud G, Piver E, Allez M, Mary JY, Sokol H, Colombel JF, Seksik P. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Jun;20(6):978-86.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):229-41.

- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2277-85.
- Rehg KL, Sanchez JE, Krieger BR, Marcet JE. Fecal diversion in perirectal fistulizing Crohn's disease is an underutilized and potentially temporary means of successful treatment. *Am Surg*. 2009 Aug;75(8):715-8.
- Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1354-62.
- Ringheanu M, Daum F, Markowitz J, Levine J, Katz S, Lin X, Silver J. Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Nov;10(6):801-10.
- Robertson CE, Harris JK, Wagner BD, Granger D, Browne K, Tatem B, Feazel LM, Park K, Pace NR, Frank DN. Explicet: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data. *Bioinformatics*. 2013 Dec 1;29(23):3100-1.
- Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 14;12(30):4819-31.
- Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, Mazmanian SK. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*. 2011 May 20;332(6032):974-7.
- Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, Correale C, Spinelli A, Pagano N, Arena V, Maggiano N, Repici A, Malesci A, Danese S. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):762-70.
- Rutgeerts P, Goobes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet*. 1991 Sep 28;338(8770):771-4.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):253-61.

Saleh M, Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jan;11(1):9-20.

Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):577-94.

Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghraieb J. Chimeric anti-TNFalpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine*. 1995 7, 251–259.

Schäffler H, Schneider N, Hsieh CJ, Reiner J, Nadalin S, Witte M, Königsrainer A, Blumenstock G, Lamprecht G. NOD2 mutations are associated with the development of intestinal failure in the absence of Crohn's disease. *Clin Nutr*. 2013 Dec;32(6):1029-35.

Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987 Dec 24;317(26):1625-9.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun 24;12(6):R60.

Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Doré J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003 Feb;52(2):237-42.

Seksik P, Landman C. Understanding Microbiome Data: A Primer for Clinicians. *Dig Dis*. 2015 Sep 14;33 Suppl 1:11-16.

Shen C, Assche GV, Colpaert S, Maerten P, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Feb 1;21(3):251-8.

Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci*. 2006 May 15;119(Pt 10):2095-106.

Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DP, Wu J, Annese V, Achkar JP, Goyette P, Scott R, Xu W, Barmada MM, Klei L, Daly MJ, Abraham C, Bayless TM, Bossa F, Griffiths AM, Ippoliti AF, Lahaie RG, Latiano A, Paré P, Proctor DD, Regueiro MD, Steinhart AH, Targan SR, Schumm LP, Kistner EO, Lee AT, Gregersen PK, Rotter JI, Brant SR, Taylor

KD, Roeder K, Duerr RH. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):216-20.

Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013 Aug 2;341(6145):569-73.

Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Doré J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Feb;12(2):106-11.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 28;105(43):16731-6.

Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Aug;15(8):1183-9.

Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, Bernklev T, Henriksen M, Sauar J, Vatn MH, Moum B; IBSEN Study Group. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(4):431-40.

Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol.* 2004 Jun;5(6):569-73.

Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Jul;14(7):968-76.

Steenholdt C, Frederiksen MT, Bendtzen K, Ainsworth MA, Thomsen OØ, Brynskov J. Time Course and Clinical Implications of Development of Antibodies Against Adalimumab in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2016 Jul;50(6):483-9.

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jan;6(1):9-20.

- Suenaert P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002 Aug;97(8):2000-4.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Doerffel Y. Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Feb;14(2):147-61.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*. 1994 Dec 1;180(6):2359-64.
- Timmer A. Epidemiologie der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B Hrsg Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Handbuch für die Praxis. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009: 8–24.
- Toedter G, Li K, Sague S, Ma K, Marano C, Macoritto M, Park J, Deehan R, Matthews A, Wu GD, Lewis JD, Arijis I, Rutgeerts P, Baribaud F. Genes associated with intestinal permeability in ulcerative colitis: changes in expression following infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Aug;18(8):1399-410.
- Toh JW, Stewart P, Rickard MJ, Leong R, Wang N, Young CJ. Indications and surgical options for small bowel, large bowel and perianal Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Oct 28;22(40):8892-8904.
- Tong M, Li X, Wegener Parfrey L, Roth B, Ippoliti A, Wei B, Borneman J, McGovern DP, Frank DN, Li E, Horvath S, Knight R, Braun J. A modular organization of the human intestinal mucosal microbiota and its association with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e80702.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008 Feb;117(2):244-79.
- Trikudanathan G, Venkatesh PG, Navaneethan U. Diagnosis and therapeutic management of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2012 Dec 24;72(18):2333-49.

Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niino H, Akashi K, Horiuchi T. The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor α . *Inflamm Bowel Dis*. 2013 May;19(6):1224-31.

Ungar B, Levy I, Yavne Y, Yavzori M, Picard O, Fudim E, Loebstein R, Chowers Y, Eliakim R, Kopylov U, Ben-Horin S. Optimizing Anti-TNF- α Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 Apr;14(4):550-557.e2.

Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):253-61.

Van den Brande JM, Koehler TC, Zelinkova Z, Bennink RJ, te Velde AA, ten Cate FJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut*. 2007 Apr;56(4):509-17.

van der Have M, van der Aalst KS, Kaptein AA, Leenders M, Siersema PD, Oldenburg B, Fidder HH. Determinants of health-related quality of life in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis*. 2014 Feb;8(2):93-106.

van der Velden WJ, Blijlevens NM, Maas FM, Schaap NP, Jansen JH, van der Reijden BA, Feuth T, Dolstra H, Donnelly JP. NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Aug;44(4):243-8.

van Dussen KL, Liu TC, Li D, Towfic F, Modiano N, Winter R, Haritunians T, Taylor KD, Dhall D, Targan SR, Xavier RJ, McGovern DP, Stappenbeck TS. Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2014 Jan;146(1):200-9.

van Limbergen J, Radford-Smith G, Satsangi J. Advances in IBD genetics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jun;11(6):372-85.

Veltkamp C, Anstaett M, Wahl K, Möller S, Gangl S, Bachmann O, Hardtke-Wolenski M, Länger F, Stremmel W, Manns MP, Schulze-Osthoff K, Bantel H. Apoptosis of regulatory T

lymphocytes is increased in chronic inflammatory bowel disease and reversed by anti-TNF α treatment. *Gut*. 2011 Oct;60(10):1345-53.

Virta L, Auvinen A, Helenius H, Huovinen P, Kolho KL. Association of repeated exposure to antibiotics with the development of pediatric Crohn's disease--a nationwide, register-based finnish case-control study. *Am J Epidemiol*. 2012 Apr 15;175(8):775-84.

Vital M, Penton CR, Wang Q, Young VB, Antonopoulos DA, Sogin ML, Morrison HG, Raffals L, Chang EB, Huffnagle GB, Schmidt TM, Cole JR, Tiedje JM. A gene-targeted approach to investigate the intestinal butyrate-producing bacterial community. *Microbiome*. 2013 Mar 4;1(1):8.

Volz T, Nega M, Buschmann J, Kaesler S, Guenova E, Peschel A, Röcken M, Götz F, Biedermann T. Natural *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. *FASEB J*. 2010 Oct;24(10):4089-102.

Vos AC, Wildenberg ME, Arijis I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, Vermeire S, Rutgeerts P, van den Brink GR, Hommes DW. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Mar;18(3):401-8.

Vyas U, Ranganathan N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:872716.

Wang W, Chen L, Zhou R, Wang X, Song L, Huang S, Wang G, Xia B. Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb;52(2):398-406.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1658-64.

Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005 Sep;2(9):406-15.

Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K,

- Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 13;102(50):18129-34.
- Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *J Crohns Colitis*. 2010 Nov;4(5):523-31.
- Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 May;15(5):653-60.
- Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Järnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*. 2010 Dec;139(6):1844-1854.e1.
- Wills ES, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, Pierik MJ, Penders J. Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation. *PLoS One*. 2014 Mar 7;9(3):e90981.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):69-75.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):105-8.
- Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR. Effect of fecal diversion alone on perianal Crohn's disease. *World J Surg*. 2000 Oct;24(10):1258-62; discussion 1262-3.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease. *N Engl J Med*. 2002 Oct 10;347(15):1199-200.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*. 2004 Feb;134(2):465-72.
- Zundler S, Neurath MF. Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases: functional role of T cells and T cell homing. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 92):S19-28.

8. Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adalimumab
APC	Antigen-präsentierende Zelle
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CDAI	Crohns Disease Activity Index
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Etylendiamintetraacetat
Fab	Antigenbindendes Fragment
Fc	Kristallisierbares Fragment
GI	Gastrointestinal
GPR43	G-protein gekoppelten Rezeptor 43
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
IFN- γ	Interferon- γ
IFX	Infliximab
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LEfSe	Linear discriminant analysis Effect Size
LDA	Linear discriminant analysis
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramy Dipeptid
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
NK	Natürliche Killer
NMDS	Non-metric multidimensional scaling
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2
NF- κ B	Nukleären Faktor- κ B
OTU	Operational taxonomic unit
PGN	Peptidoglykan
PSA	Polysaccharid A
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SBS	Sequencing-by-Synthesis
SNP	Single-nucleotide polymorphisms
sTNF	Löslicher Tumornekrosefaktor
TH	T-Helfer
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
tmTNF	transmembranöser Tumornekrosefaktor
TNF	Tumornekrosefaktor

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Lamprecht, Direktor der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie, für die Möglichkeit diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können, bedanken.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Schäffler für die ausgezeichnete Betreuung und unglaubliche Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Herlemann für die großartige Unterstützung danken.

Danken möchte ich außerdem Herrn Professor Kreikemeyer und Frau Normann vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene.

Ein großer Dank geht auch an Frau Dr. Berlin und Frau Bannert.

Lebenslauf

Name:
Vorname:
Adresse:
Geburtsdatum:
Staatsangehörigkeit:

Alberts
Christian
Blücherstraße 65, 18055 Rostock
11.05.1989
deutsch

09/1999 – 06/2008

Kippenberg Gymnasium Bremen

09/2008 – 05/2009

Zivildienst. Rotes Kreuz Krankenhaus Bremen

10/2009 – 06/2010

Studium der Pflanzenbiotechnologie. Universität Hannover

10/2010 – 11/2016

Studium der Humanmedizin, Universität Rostock

11/2016 Approbation als Arzt

01/2017

Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemeine-, Thorax-,
Gefäß- und Transplantationschirurgie

Chirurgische Universitätsklinik Rostock

Einfluss klinischer Parameter auf die Mukosa-assoziierte bakterielle Zusammensetzung in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Thesen:

- Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehen mit einer Dysbiose einher.
- Das Ausmaß der Krankheitsaktivität (gemessen in CDAI bzw. Mayo Score) spiegelt sich in der Bakterienzusammensetzung wieder.
- Die TNF- α -Blocker, die eine wichtige Rolle in der Therapie des MC spielen, führen zu einer Wiederherstellung der mukosalen Bakterienzusammensetzung.
- Die Bakterienzusammensetzung im Darm ist abhängig von der Tatsache, ob die Proben aus makroskopisch entzündlich veränderten oder makroskopisch gesunden Darmabschnitten entnommen wurden.
- Das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation führt zu einer veränderten Bakterienzusammensetzung im Darm.
- Es existieren bestimmte Bakterienstämme, welche bei einer höheren Krankheitsaktivität verstärkt auftreten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Auch versichere ich, dass mir die Bestimmungen der Promotionsordnung bekannt sind und ich diese anerkenne.

Rostock, 13.07.2018

Christian Alberts